



Apports des modèles non linéaires à effets mixtes dans l'étude de la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique des médicaments antithrombotiques

Xavier Delavenne

► To cite this version:

Xavier Delavenne. Apports des modèles non linéaires à effets mixtes dans l'étude de la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique des médicaments antithrombotiques. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2011. Français. NNT : 2011STET002T . tel-00691432

HAL Id: tel-00691432

<https://theses.hal.science/tel-00691432>

Submitted on 26 Apr 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE Jean Monnet – SAINT-ETIENNE
Ecole Doctorale Sciences, Ingénieries et Santé, ED 488

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE SAINT-ETIENNE
Discipline Pharmacologie Clinique

Présenté et soutenu publiquement par

Xavier DELAVENNE

Le 21 avril 2011

APPORTS DES MODELES NON LINEAIRES A EFFETS MIXTES DANS L'ETUDE DE LA VARIABILITE PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE DES MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES

Thèse dirigée par le Dr Silvy LAPORTE

EA3065 - Groupe de Recherche sur la Thrombose et Pharmacologie des
Antithrombotiques dans les situations à Risque (GRT-PAR)

Jury :

Rapporteurs :	Professeur François GUEYFFIER Professeur Nicolas SIMON Docteur Chantal LE GUELLEC
Examineurs :	Professeur Patrick MISMETTI Docteur Silvy LAPORTE

Sommaire

SOMMAIRE	2
-----------------	----------

INTRODUCTION	9
---------------------	----------

PARTIE I - GENERALITES LA PHARMACOLOGIE ET LES PRINCIPALES SOURCES DE VARIABILITE DES ANTITHROMBOTIQUES ET LA MODELISATION EN PHARMACOLOGIE	13
--	-----------

1 PHARMACOLOGIE DES MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES ETUDIES	14
--	-----------

1.1 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DU FONDAPARINUX	14
--	-----------

1.2 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES AVK	15
--	-----------

1.2.1 PROPRIETES CHIMIQUES	15
----------------------------	----

1.2.2 PHARMACOCINETIQUE DES AVK	16
---------------------------------	----

1.2.3 PHARMACODYNAMIE DES AVK	17
-------------------------------	----

1.2.4 CORRELATION INR ET EFFET CLINIQUE	19
---	----

1.3 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DU CLOPIDOGREL	20
---	-----------

1.3.1 PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES	20
-------------------------------------	----

1.3.2 PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES	21
-------------------------------------	----

1.3.3 CORRELATION TESTS DE LA FONCTION PLAQUETTAIRE ET EFFET CLINIQUE	22
---	----

2 LES PRINCIPALES SOURCES DE VARIABILITE DES ANTITHROMBOTIQUES	23
---	-----------

2.1 LES SOURCES DE VARIABILITE ACQUISES	23
--	-----------

2.1.1 CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES	23
---------------------------------------	----

2.1.2 INSUFFISANCE RENALE	24
---------------------------	----

2.1.3 INSUFFISANCE HEPATIQUE	25
------------------------------	----

2.2 LES SOURCES DE VARIABILITE INNEES	25
--	-----------

2.3 LES INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES	27
---	-----------

2.4 L'ENVIRONNEMENT	28
----------------------------	-----------

2.5 L'OBSERVANCE AU TRAITEMENT	29
---------------------------------------	-----------

3 LES PRINCIPES DE LA MODELISATION	30
---	-----------

3.1 ESTIMATION DES PARAMETRES MOYENS PAR LA METHODE STANDARD EN DEUX ETAPES	32
--	-----------

3.2 DETERMINATION DES PARAMETRES PAR APPROCHE DE POPULATION	32
--	-----------

3.3	PRINCIPE GENERAUX DE LA MODELISATION PAR APPROCHE DE POPULATION	34
------------	--	-----------

PARTIE II : EVALUATION DE LA VARIABILITE PHARMACOCINETIQUE DU FONDAPARINUX DANS UNE POPULATION NON SELECTIONNEE DE PATIENTS ET DANS UNE POPULATION DE PATIENTS SELECTIONNES INSUFFISANTS RENAUX	35
--	-----------

<u>4</u>	<u>ÉTUDE DE LA VARIABILITE PHARMACOCINETIQUE DU FONDAPARINUX DANS UNE POPULATION DE PATIENTS NON SELECTIONNEE - ETUDE POP-A-RIX</u>	<u>36</u>
-----------------	--	------------------

4.1	INTRODUCTION	36
4.1.1	CONTEXTE DE L'ETUDE POP-A-RIX	36
4.1.2	OBJECTIF DE L'ETUDE	38
4.2	PATIENTS ET METHODES	38
4.2.1	PLAN DE L'ETUDE	38
4.2.2	PATIENTS ET TRAITEMENT	39
4.2.3	COLLECTION DES DONNEES ET METHODE DE DOSAGE	39
4.2.4	ANALYSE DES DONNEES	40
4.2.5	POURQUOI UN MNLEM DANS L'ETUDE POP-A-RIX	43
4.3	RESULTATS	44
4.3.1	DESCRIPTION DES PATIENTS	44
4.3.2	DESCRIPTION DES PRELEVEMENTS	45
4.3.3	CONSTRUCTION DU MODELE	45
4.3.4	ÉVALUATION DU MODELE	49
4.4	APPORTS DES MODELES NON LINEAIRES A EFFETS MIXTES DANS L'ETUDE POP-A-RIX	51
4.4.1	SIMULATIONS	51
4.4.2	ESTIMATIONS INDIVIDUELLES BAYESIENNES	56
4.5	DISCUSSION SUR LES RESULTATS DE L'ETUDE	57

<u>5</u>	<u>ETUDE DE LA VARIABILITE DU FONDAPARINUX DANS LA PREVENTION DE LA MVTE APRES UNE CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE MAJEURE DANS UNE POPULATION DE PATIENTS INSUFFISANTS RENAUX - ETUDE PROPICE</u>	<u>60</u>
-----------------	--	------------------

5.1	INTRODUCTION	60
5.1.1	CONTEXTE	60
5.1.2	OBJECTIF DE L'ETUDE	62
5.2	PATIENTS ET METHODES	62

5.2.1	PLAN DE L'ETUDE	62
5.2.2	PATIENTS ET TRAITEMENTS	63
5.2.3	COLLECTION DES DONNEES ET METHODES DE DOSAGE	63
5.2.4	ANALYSE DES DONNEES	64
5.2.5	INTERET DES MNLEM DANS L'ETUDE PROPICE	64
5.3	RESULTATS	65
5.3.1	DESCRIPTION DE LA POPULATION	65
5.3.2	DESCRIPTIONS DU TRAITEMENT	66
5.3.3	DESCRIPTION DES PRELEVEMENTS ET OPTIMISATIONS DES TEMPS DE PRELEVEMENT	67
5.3.4	MODELISATION PHARMACOCINETIQUE	67
5.3.5	VALIDATION DU MODELE PK	70
5.3.6	APPORTS DES MODELES MNLEM DANS L'ETUDE PROPICE	71
5.4	DISCUSSION SUR L'ETUDE PROPICE	76

PARTIE III : L'UTILISATION DES MNLEM POUR RESUMER UN MODELE DE REPONSE COMPLEXE DE RELATION PHARMACOCINETIQUE - PHARMACODYNAMIQUE AVEC LA FLUINDIONE ET L'ACENOCOUMAROL, ET LA PRISE EN COMPTE DE COVARIABLES NOTAMMENT DES FACTEURS GENETIQUES.	78
---	-----------

6 MODELISATION PK/PD POUR PREDIRE L'IMPACT DU POLYMORPHISME GENETIQUE DE CYP2C9 ET VKORC1 SUR LA FLUINDIONE ET L'ACENOCOUMAROL.

6.1	INTRODUCTION	79
6.1.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	79
6.1.2	OBJECTIFS DE L'ETUDE	80
6.2	PATIENTS ET METHODES	80
6.2.1	PLAN DE L'ETUDE	80
6.2.2	DESCRIPTION DES SUJETS VOLONTAIRES	81
6.2.3	PRELEVEMENTS SANGUINS	81
6.2.4	GENOTYPAGE	81
6.2.5	METHODES ANALYTIQUES	82
6.2.6	INTERET DE L'UTILISATION D'UN MNLEM DANS CETTE ETUDE	82
6.2.7	MODELISATION PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE	82
6.3	RESULTATS	87

6.3.1	CARACTERISTIQUES DES SUJETS	87
6.3.2	CONSTRUCTION DU MODELE PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE DE LA FLUINDIONE	89
6.3.3	MODELE PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE DE L'ACENOCOUMAROL	95
6.3.4	APPORTS DES MNLEM DANS CETTE ETUDE	100
6.4	DISCUSSION DES RESULTATS DE CETTE ETUDE	104

PARTIE IV : UTILISATION DES MNLEM POUR EVALUER DES INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES

107

7 ETUDE DE L'INTERACTION MEDICAMENTEUSE ENTRE ACENOCOUMAROL ET AMOXICILLINE + ACIDE CLAVULANIQUE

108

7.1	INTRODUCTION	108
7.1.1	RAPPELS PHARMACOLOGIQUES DE L'AMOXICILLINE + ACIDE CLAVULANIQUE	108
7.1.2	CONTEXTE	110
7.1.3	OBJECTIF DE L'ETUDE	110
7.2	PATIENTS ET METHODES	110
7.2.1	APPORTS DES MNLEM DANS CETTE ETUDE	110
7.2.2	PLAN EXPERIMENTAL	111
7.2.3	CRITERES D'INCLUSION ET DE NON INCLUSION	112
7.2.4	TRAITEMENTS ETUDIES	112
7.2.5	DOSAGES	113
7.2.6	ANALYSE NON COMPARTIMENTALE	113
7.2.7	MODELISATION PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE	114
7.2.8	ANALYSE PHARMACOCINETIQUE / PHARMACODYNAMIQUE	115
7.3	RESULTATS	117
7.3.1	DESCRIPTION DE LA POPULATION	117
7.3.2	ANALYSE NON COMPARTIMENTALE	117
7.3.3	MODELISATION PHARMACOCINETIQUE	119
7.3.4	MODELISATION PHARMACOCINETIQUE - PHARMACODYNAMIQUE	126
7.4	INTERETS DES MNLEM DANS CETTE ETUDE	130
7.5	DISCUSSION	131

8	ÉTUDE DE L'INTERACTION MEDICAMENTEUSE ENTRE CLOPIDOGREL ET LA FLUOXETINE : ÉTUDE PLATINE	134
8.1	INTRODUCTION	134
8.1.1	RAPPEL PHARMACOLOGIQUE SUR LA FLUOXETINE	134
8.1.2	CONTEXTE	135
8.1.3	OBJECTIF DE L'ETUDE	137
8.2	SUJETS ET METHODES	137
8.2.1	APPORTS DES MNLEM DANS CETTE ETUDE	137
8.2.2	SUJETS	138
8.2.3	PLAN DE L'ETUDE	138
8.2.4	PRELEVEMENTS SANGUINS	139
8.2.5	METHODES D'ANALYSE	139
8.2.6	ANALYSE DES RESULTATS	142
8.3	RESULTATS	144
8.3.1	DESCRIPTION DE LA POPULATION	144
8.3.2	DESCRIPTION DE LA PHARMACOCINETIQUE DU METABOLITE ACTIF	144
8.3.3	CORRELATIONS ENTRE CONCENTRATIONS DE METABOLITES ACTIFS ET TESTS DE LA FONCTION PLAQUETTAIRE	145
8.4	DISCUSSION	147
	DISCUSSION GENERALE	149
	REFERENCES	152
	LISTES DES TABLES ET FIGURES	167
	LISTES DES PUBLICATIONS	170

Liste des abréviations

AM+AC : Amoxicilline plus acide clavulanique

Anti-Xa : activité anti facteur X activé

ANOVA : Analyse de variance

AUC : Aire sous la courbe

AVK : Médicament antivitamine K

BMI : Body mass index

BSA : Body surface area

Cl/F : Clairance apparente d'élimination

ClCr_{C&G} : clairance de la cratinine selon la formule de Cockcroft & Gault

ClCr_{MDRD} : clairance de la cratinine selon la formule MDRD simplifiée

C_{max} : Concentration maximum

C_{min} : Concentration minimum

CNIL : Commission Nationale

Informatique et Liberté

CYP450 2C9 : Cytochrome P450 2C9

Ddl : Degré de liberté

DV : Concentration observée

E() : Effet du médicament

E₀ : Effet dans les conditions initiales

EC₅₀ : Concentration nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximum

E_{max} : Effet maximal

EP : Embolie pulmonaire

F : Biodisponibilité

FDA: Food and drug administration

FH : Fracture de Hanche

FO : First order estimation

FOCE : First order conditional estimation

HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IC : Intervalle de confiance

INR : International Normalized Ratio

IOV : Variabilité inter-occasion

IPRED : Prédiction individuelle du modèle

ISRS : Inhibiteur Sélective de la Recapture de la sérotonine

K_a : Constante d'absorption

k_{deg} : Constante de vitesse de dégradation de la réponse

k_{syn} : Constante de vitesse de production de la réponse

Lag : Temps de latence

MAC : métabolite actif du clopidogrel

MCMC : Markov Chain Monte Carlo

MDRD : Modified of the Diet of Renal Disease

ME : Moyenne des erreurs

MNLEM : Modèle Non Linéaire à Effets Mixtes

MSE : moyenne des erreurs au carré

MTEV : Maladie ThromboEmbolique Veineuse

NONMEM : Non linear mixed effect model

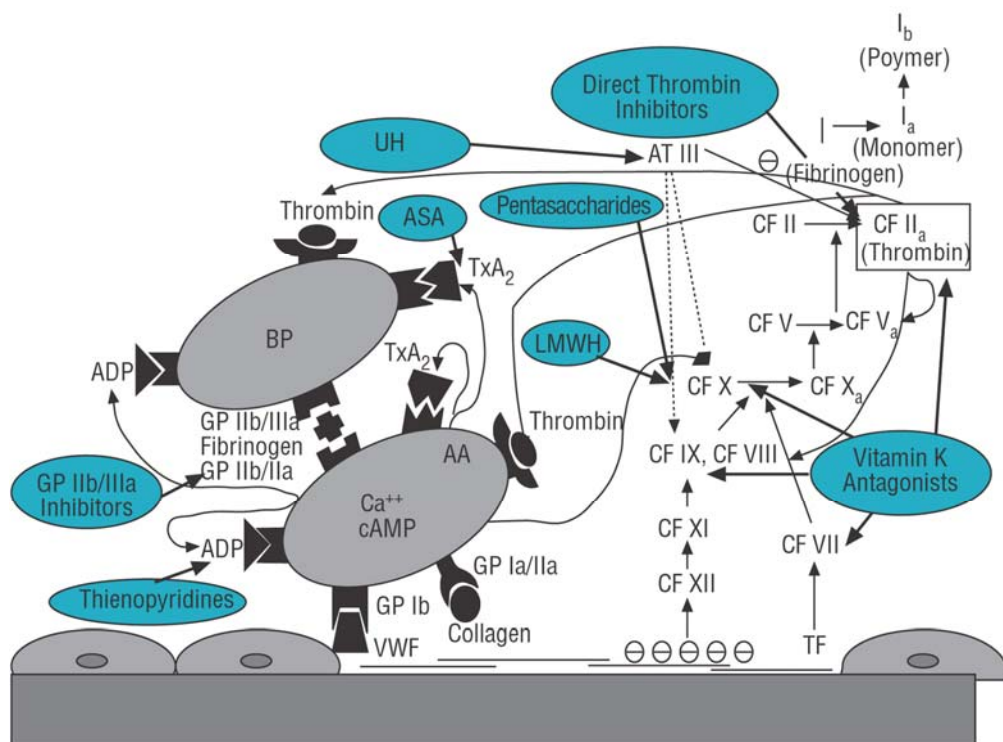
OF : Fonction objective

P-gp : glycoprotéine P

PD : Pharmacodynamie

PK : Pharmacocinétique	$t_{1/2}$: Temps de demi-vie du médicament
PRED : Prédiction du modèle	TCA : Temps de céphaline activé
PRP : Plasma Riche en Plaquette	Tmax : temps mis pour obtenir la Cmax
PT2 : Fonction hyperbolique du modèle du TP	TP : Taux de prothrombine
PTG : Prothèse Totale de Genoux	TQ : Temps de Quick
PTH : Prothèse Totale de Hanche	TVP : Thrombose veineuse profonde
Q : Clairance inter-compartimentale	V2 : Volume du compartiment central
R : Réponse	V3 : Volume du compartiment périphérique
RCP : Résumé Caractéristiques du Produit	Vd : Volume de distribution
RES : Résidu du modèle	VKORC : Vitamine K Epoxyde Réductase
SE : Erreur Standard	VPC : Visual Predictive Check
SYNTH : Constante de vitesse de production des facteurs de la coagulation	WRES : Résidus pondérés

La maladie thrombotique se définit par l'occlusion d'un vaisseau par un thrombus ou caillot sanguin. Le thrombus est formé par l'agrégation de plaquettes à la paroi vasculaire (hémostase primaire), sur lesquelles se dépose un réseau de fibrine, produit final de la coagulation (ou hémostase secondaire). Le vaisseau obturé peut être une veine comme dans la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire, ou bien une artère comme dans l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, pathologies dont la mortalité est élevée. Un certain nombre de facteurs favorisent la formation d'un thrombus tels que la présence de lésions des parois vasculaires, l'existence de turbulences ou d'une stase du flux sanguin et un état d'hypercoagulabilité sanguine. L'ensemble des relations complexes entre les différents facteurs de l'hémostase est représenté dans la Figure 1.



ASA représente l'acide acétylsalicylique ; *TxA2* le thromboxane *A2* ; *AA* l'acide arachidonique ; *AT III* l'antithrombine III ; *VWF* le facteur von Willebrand ; *GP* récepteur plaquettaire glycoprotéique ; *LMWH* les héparines de bas poids moléculaires ; *UH* les héparines non fractionnées d'après [Benito 2005]

L'objectif des traitements antithrombotiques est de modifier l'hémostase en agissant sur les mécanismes de la thrombogénèse. Trois cibles sont concernées : la réactivité plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse. Le choix de la cible à traiter et/ou de la combinaison des différentes cibles à traiter dépend de la pathologie et des mécanismes thrombogènes. Les traitements antiagrégants plaquettaires, anticoagulants et fibrinolytiques ont permis de réduire la morbidité et la mortalité des événements thromboemboliques veineux et artériels. Leur efficacité dans le traitement et la prévention de la maladie veineuse thromboembolique, des syndromes coronariens et des accidents vasculaires cérébraux est bien démontrée.

Le problème de ces traitements est que leur efficacité dépend très largement de leur intervalle thérapeutique et de leur variabilité.

Les médicaments antithrombotiques possèdent un intervalle thérapeutique étroit ce qui expose les patients soit à une majoration des effets, qui se traduit par un risque hémorragique, soit une absence d'efficacité avec pour conséquence une majoration des événements thrombotiques.

Les accidents hémorragiques liés aux médicaments antithrombotiques constituent un problème de santé majeur de part leur fréquence et leur gravité. Par exemple, les médicaments anticoagulants de type anti-vitamine K (AVK), prescrits dans plus de un pourcent de la population française, sont responsables de 13% des hospitalisations secondaires à un effet indésirable et représentent la première cause de iatrogénie en France [Affsaps]. La survenue d'une hémorragie apparaît comme fortement corrélée à la mortalité dans la prévention et le traitement de la maladie thromboembolique veineuse.

L'inefficacité des traitements antithrombotiques est également fréquente. Dans le cas du clopidogrel, médicament antiagrégant plaquettaire, 4% à 30% des patients inclus dans les études sont considérés comme mauvais répondeurs, non répondeurs ou résistants à cette thérapeutique, selon un critère de réponse biologique [Nguyen 2005]. La relation entre la non-réponse biologique au traitement et les événements cliniques est bien établie. Le risque de développer des événements cardiovasculaires est plus important pour les patients mauvais répondeurs [Combescure 2010].

Pour les médicaments antithrombotiques, l'intervalle thérapeutique étroit est associé à une grande variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique, ce qui favorise l'instabilité d'exposition, la variabilité des effets et augmente le risque de sortir de cet intervalle thérapeutique. Pour améliorer le rapport bénéfice risque de ces médicaments on peut proposer

une surveillance biologique des traitements. Différents tests d'hémostases ont été proposés selon le type de molécule. Pour la plupart de ces médicaments les tests ne sont que partiellement corrélés avec les événements cliniques. Le risque hémorragique, en particulier, est souvent mal prédit par ces tests biologiques. Pour les médicaments AVK, l'*International Normalized Ratio* (INR), test global de la coagulation est très bien corrélé avec les événements thrombotiques et hémorragiques [Eckman 1993]. Il a été démontré qu'avec un INR compris entre 2 et 3 le rapport bénéfice/risque de ces médicaments était le meilleur. Or malgré une surveillance et une adaptation des AVK à ce test biologique seulement 50% patients sont dans l'intervalle thérapeutique [Landefeld 1992]. Il faut donc envisager une autre alternative pour améliorer le rapport bénéfice/risque de ces médicaments. Elle consiste essentiellement à connaître et comprendre les différentes sources de variabilité des traitements et ainsi proposer des adaptations de traitement, *a priori* selon les caractéristiques des patients, et non *a posteriori* sur les conséquences et les effets des traitements.

Estimer la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un médicament est essentielle pour déterminer son index thérapeutique, sa posologie mais aussi pour connaître les risques particuliers dans certaines populations, et ainsi permettre d'améliorer l'efficacité et la sécurité des médicaments. La modélisation de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique d'un médicament par approche de population est une méthode pharmaco-statistique d'estimation de la variabilité.

Les analyses pharmacocinétique – pharmacodynamique de population sont des outils pharmaco-statistiques qui permettent de réaliser des analyses directement pour une population cible de patients [Sheiner 1991]. Dans ce cas, l'analyse des profils individuels n'est pas une obligation. Les modèles non linéaires à effets mixtes sont les seuls modèles capables de distinguer la variabilité inter et intra-individuelle des médicaments. Il est également possible, grâce à l'ajout de covariables dans le modèle, d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle du médicament. En pratique, cette distinction est importante car les conséquences sur l'adaptation des traitements seront différentes. Si une grande partie de la variabilité s'explique par des covariables, il est possible d'adapter les traitements *a priori* sur les caractéristiques des patients comme, par exemple, la fonction rénale pour un médicament éliminé sous forme active dans les urines. Si la majeure partie de la variabilité est non expliquée, elle ne pourra être corrigée par des adaptations posologiques que *a posteriori* après avoir déterminé les concentrations ou les effets pour chaque individu.

L'objectif de ce travail est de développer des méthodes et des modèles d'analyse, basés sur les modèles non linéaires à effets mixtes, pour mettre en évidence les différentes sources de variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique des médicaments antithrombotiques.

Ce travail se décompose en 4 parties :

La première partie constituera un rappel sur la pharmacologie et les principales sources de variabilité inter et intra-individuelle des antithrombotiques afin de situer le contexte et les principes généraux de la modélisation, notamment celle basée sur les modèles non linéaires à effets mixtes (MNLEM).

La seconde partie sera consacrée à l'intérêt des MNLEM dans l'estimation de la variabilité pharmacocinétique du fondaparinux au sein d'une population non sélectionnée de patients et d'une population de patients insuffisants rénaux.

La troisième partie présentera l'utilisation des MNLEM pour résumer un modèle de réponse complexe de relation pharmacocinétique - pharmacodynamique en prenant pour exemple la fluindione et l'acénocoumarol, associé à la prise en compte des sources de variabilités génétiques.

La quatrième partie est une application de ces mêmes modèles pour évaluer des interactions médicamenteuses avec deux exemples : l'interaction acénocoumarol-amoxicilline plus acide clavulanique et l'interaction clopidogrel-fluoxétine.

Partie I - Généralités la pharmacologie et les principales sources de variabilité des antithrombotiques et la modélisation en pharmacologie

1 Pharmacologie des médicaments antithrombotiques étudiés

1.1 Propriétés pharmacologiques du fondaparinux

Le fondaparinux est le premier anticoagulant possédant une activité inhibitrice spécifique du facteur X activé (anti-Xa). Il s'agit d'un pentasaccharide sulfaté de synthèse (figure 2). Son action anti-Xa nécessite l'intermédiaire de l'antithrombine. Le fondaparinux se fixe de façon spécifique sur le site de liaison de l'héparine à l'antithrombine, principal inhibiteur physiologique de la coagulation (figure 3) [Petitou 1991; Petitou 2004]. Le défaut d'activation du facteur Xa interrompt la cascade de la coagulation, et le complexe prothrombinase, et inhibe à la fois la formation de la thrombine et le développement du thrombus [Walenga 1988; Lormeau 1995].

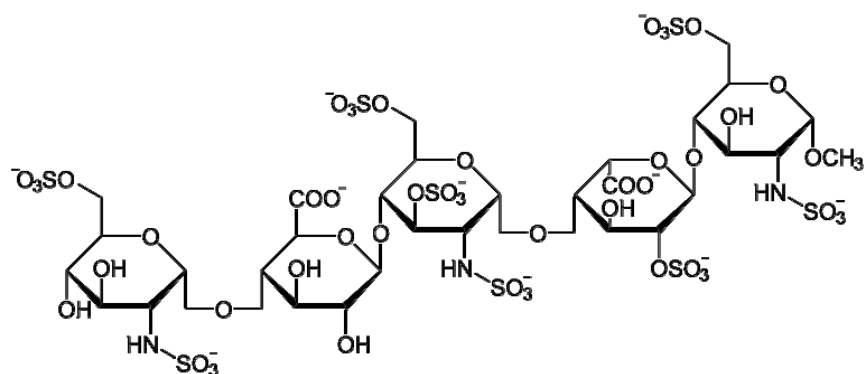


Figure 2. Structure chimique du fondaparinux

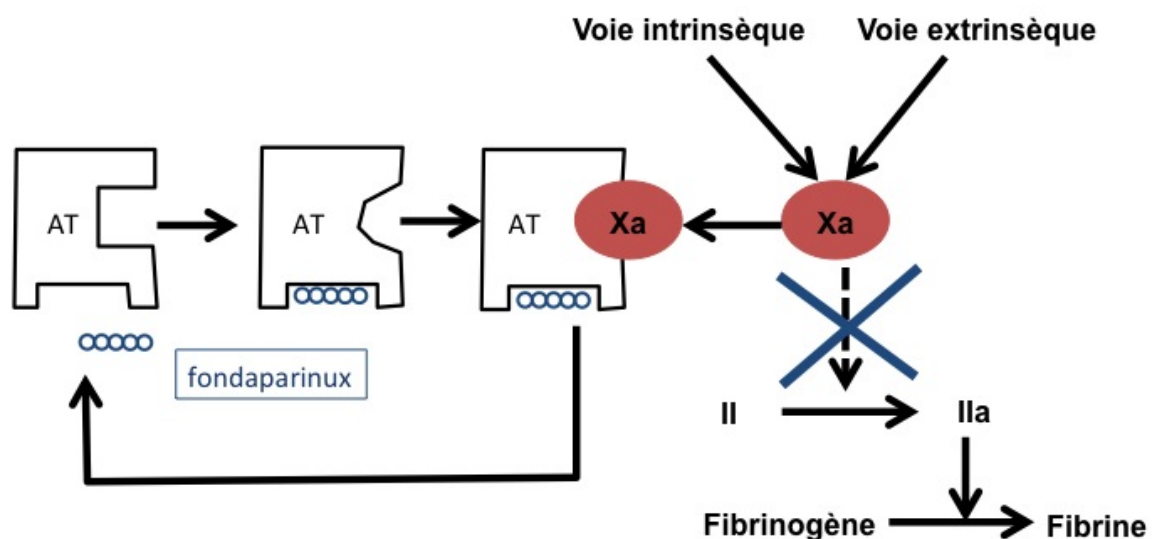


Figure 3. Mécanisme d'action du fondaparinux

Du point de vue pharmacocinétique, le fondaparinux est entièrement et rapidement absorbé après une administration par voie sous-cutanée. La concentration plasmatique maximale est obtenue environ 2 heures après l'administration. Le volume de distribution varie de 7 à 11 L. Le fondaparinux ne se fixe pas de façon significative aux protéines plasmatiques mis à part sa liaison spécifique à l'antithrombine. Le fondaparinux n'est pas métabolisé et aucune interaction n'est attendue par modulation de l'activité des cytochromes P450.

Dans les populations âgées, compte tenu de la possible altération de la fonction rénale, la capacité à éliminer le médicament est réduite. Pour les sujets de plus de 75 ans, la clairance d'élimination est diminuée de 16 à 32% par rapport aux sujets de plus de 65 ans. La concentration maximum observée chez les sujets âgés est 30% plus importante que chez les autres volontaires.

Dans l'insuffisance rénale modérée, la clairance d'élimination est diminuée de 50% par rapport aux sujets avec une fonction rénale normale (clairance de la créatinine > 80 mL/min). Pour l'insuffisance rénale sévère, la clairance est diminuée de 80%. La demi-vie d'élimination augmente à 29 heures chez l'insuffisant rénal modéré et à 72 heures chez l'insuffisant rénal sévère, contre 21 h chez le sujet avec une fonction rénale normale.

1.2 Propriétés pharmacologiques des AVK

1.2.1 Propriétés chimiques

Les AVK se répartissent en deux familles chimiques : la famille coumarinique et la famille de l'indanedione.

Les coumariniques

- Acénocoumarol : Sintrom® (comprimés à 4 mg), Minisintrom® (comprimés à 1mg)
- Warfarine : Coumadine® (comprimés à 2 et 5 mg)
- Phénindione : non commercialisé en France

Les dérivés de l'indane-1,3-dione

- fluindione : Préviscan® (comprimés à 20 mg)

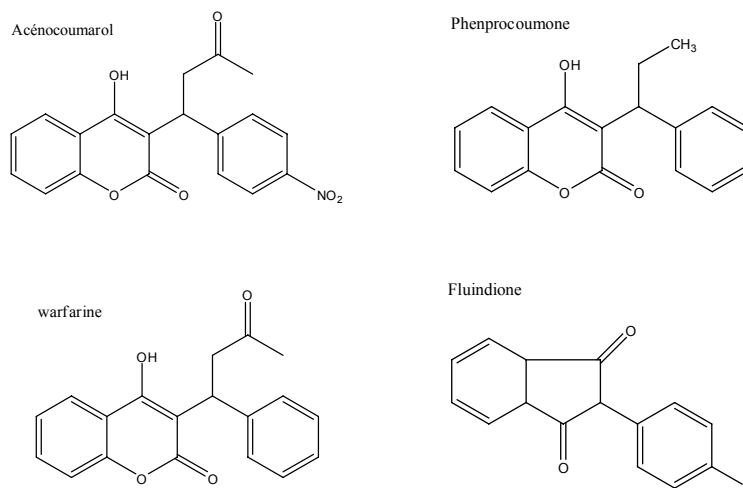


Figure 4: Structures chimiques des AVK

En France, trois molécules sont disponibles : l'acénocoumarol, la fluindione et la warfarine. La fluindione, dérivé indane-dione représente 65% des prescriptions des AVK en France [Warot 2000; Pengo 2006]. La warfarine est le principal médicament prescrit dans le monde et en particulier en Angleterre et aux Etats-Unis alors que l'acénocoumarol, son dérivé nitré est plus largement utilisé en Europe. La phenprocoumon est commercialisée aux Pays-Bas.

1.2.2 Pharmacocinétique des AVK

Les AVK sont administrés par voie orale et présentent une absorption rapide et importante (plus de 80%) au niveau du tube digestif. Les concentrations plasmatiques maximales sont observées entre 2 et 6 heures après ingestion selon la molécule. Dans le plasma, les AVK sont présents sous forme liée aux protéines plasmatiques (97%). Ces molécules sont lipophiles ce qui explique leur diffusion au niveau du foie, du poumon, du rein, de la rate, dans le lait maternel et leur passage à travers la barrière placentaire.

Les AVK sont principalement métabolisés au niveau hépatique par oxydation et hydroxylation pour donner des dérivés inactifs. La biotransformation de ces dérivés est sous la dépendance de systèmes enzymatiques de la famille des cytochromes et principalement du cytochrome P450 2C9 (CYP450 2C9). Les AVK subissent un cycle entéro-hépatique et une élimination urinaire sous forme active ou métabolisée.

La demi-vie d'élimination varie entre les 3 molécules, avec un AVK à demi-vie courte (acénocoumarol, environ 8h), un AVK à demi-vie intermédiaire (fluindione, 30h) et un AVK à demi-vie longue (warfarine, environ 40h).

Parmi ces propriétés pharmacocinétiques, la forte liaison aux protéines plasmatiques ainsi que le polymorphisme génétique important au niveau du CYP450 2C9 exposent au risque de nombreuses interactions médicamenteuses dès lors que le médicament concomitant est lié aux mêmes protéines plasmatiques ou métabolisé par le même système enzymatique [Aithal 1999; Daly 2003].

1.2.3 Pharmacodynamie des AVK

La vitamine K ou phytoménadione est nécessaire à la carboxylation post translationnelle des résidus glutamate de certaines protéines (figure 5). Les protéines ainsi carboxylées interviennent dans la coagulation : ce sont quatre facteurs activateurs (facteurs II, VII, IX, X) et deux inhibiteurs (protéine C et S) (tableau 1).

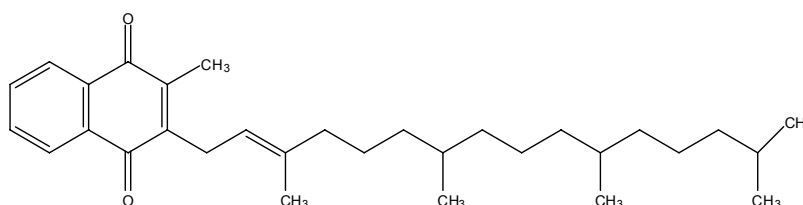


Figure 5: Structure chimique de la vitamine K

Les sources de vitamine K sont l'alimentation et la flore bactérienne. Les besoins journaliers sont de 50 à 100 µg. Sa concentration est faible dans le plasma : 0,5 µg/l. Des facteurs exogènes peuvent en modifier les sources : par exemple apport excessif en chou (riche en vitamine K) ou prise d'antibiotiques qui détruisent partiellement la flore intestinale.

Les AVK inhibent compétitivement la K-Epoxyde réductase et la K-NADH réductase responsables de la régénération de la vitamine K (KH₂) à partir de la vitamine K oxydée sous forme d'époxyde (figure 6).

Figure 6 : Mécanisme d'action des AVK

Il en résulte une inhibition de la synthèse des protéines vitamine K dépendantes actives et une chute de leurs concentrations plasmatiques.

L'activité des facteurs procoagulants étant supérieure à celle des facteurs anticoagulants, l'action des AVK sera anticoagulante. Cette action est donc indirecte, liée à la libération progressive dans le plasma de ces facteurs non fonctionnels. La rapidité de leur décroissance dépend de leur demi-vie (Tableau 1).

Tableau 1. Temps de demi-vie des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendant

Facteurs de la coagulation vitamine K dépendant		Demi- vie
II	Prothrombine	60 h
VII	Proconvertine	6 h
IX	Antihémophilique	24 h
X	Stuart	40 h
PC	Protéine C	6 h
PS	Protéine S	30-36 h

Du fait de la diminution de la synthèse des facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants, les AVK induisent une hypoprothrombinémie dans les 24 à 36 heures après leur administration et leur action anticoagulante peut persister quatre jours après l'arrêt du traitement. Les AVK ne sont donc pas des anticoagulants instantanés. L'effet des AVK sur les différents facteurs de la coagulation est résumé par deux indices calculés à partir du temps de Quick (TQ) : le taux de prothrombine (TP) et l'*International Normalized Ratio* (INR). Le TQ est le temps nécessaire au sang pour coaguler en présence de calcium et de facteur tissulaire. Il permet d'explorer les facteurs de la coagulation II, V, VII, X dont trois sont des facteurs vitamine K dépendants (II, VII, X). Le TP correspond à un TQ normalisé à un temps témoin. Il ne tient pas compte des variabilités inter laboratoire. L'INR lui tient compte du réactif de laboratoire. C'est pourquoi il est actuellement recommandé pour exprimer l'effet anticoagulant des AVK.

$$TP = \frac{TQ_{\text{témoin}}}{TQ_{\text{patient}}} \qquad INR = \left(\frac{TQ_{\text{patient}}}{TQ_{\text{témoin}}} \right)^{ISI}$$

En dehors de tout traitement par AVK, l'INR est de 1 ; sous traitement AVK, l'INR est supérieur à 1.

1.2.4 Corrélation INR et effet clinique

L'intérêt de ce paramètre pharmacodynamique est qu'il est corrélé, contrairement à la dose d'AVK, aux événements cliniques. En effet, les études montrent que le risque thrombotique et le risque hémorragique des AVK sont liés à l'intensité du traitement évalué par l'INR. La représentation graphique d'Eckman [Eckman 1993] (figure 7) nous montre que le rapport bénéfice/risque des AVK est la conséquence du risque thromboembolique en cas d'insuffisance du traitement et du risque hémorragique en cas de surdosage : le rapport est optimal pour un intervalle d'INR étroit compris entre 2 et 3. Le problème de ce type de traitement est de parvenir à déterminer la dose optimale permettant d'obtenir un INR dans l'index thérapeutique, relativement étroit.

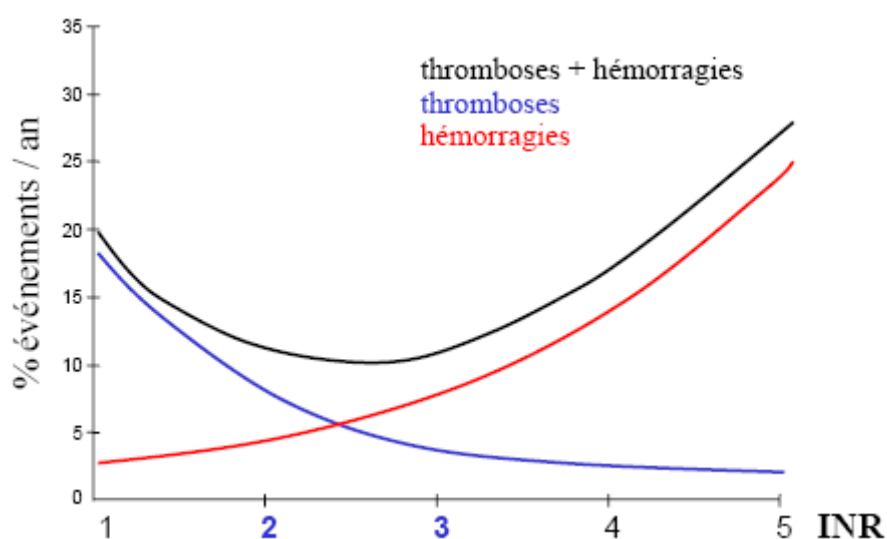


Figure 7. Corrélation INR - risque hémorragique et thrombotique

L'âge, l'insuffisance hépatique et le polymorphisme génétique du cytochrome P450 intervenant dans le métabolisme hépatique des AVK sont responsables d'une partie de la variation interindividuelle de leur effet anticoagulant [Russmann 1997; Ansell 2004]. Des phénomènes de résistance héréditaire aux AVK ont été décrits dans des familles de patients. Dans ces familles, l'affinité de l'anticoagulant pour sa cible est diminuée. Les doses d'AVK à administrer à ces patients doivent être 5 à 20 fois supérieures à celles recommandées [O'Reilly 1964]. Enfin, une mutation du facteur IX, retrouvée dans 1,5 % de la population,

entraîne une réduction du facteur IX en présence de dérivés coumariniques et augmente le risque de saignement pendant la durée du traitement [Oldenburg 1997].

Parallèlement à cette variabilité interindividuelle (qu'il faut prendre en compte pour déterminer la dose initiale du traitement), les AVK présentent une forte variabilité intra-individuelle, c'est à dire une instabilité de l'INR dans le temps, à doses inchangées.

1.3 Propriétés pharmacologiques du clopidogrel

Le clopidogrel (Plavix®) est un médicament antiagrégant plaquettaire. Il est, avec l'aspirine, un médicament majeur utilisé dans la prévention secondaire des événements athérothrombotiques : infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral ischémique. Le clopidogrel a même démontré une efficacité supérieure à l'aspirine dans les cas d'association à une artériopathie oblitérante des membres inférieurs.

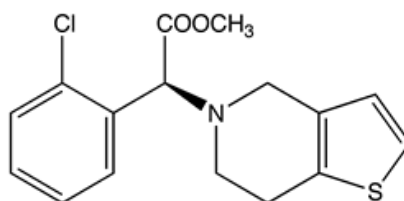


Figure 8. Structure chimique du clopidogrel

1.3.1 Propriétés pharmacocinétiques

Le clopidogrel est rapidement absorbé par voie orale. Après l'administration orale d'une dose de 75 mg, la concentration maximale est atteinte dans les 45 minutes suivant la prise du médicament. Le clopidogrel est rapidement distribué et il se lie fortement aux protéines plasmatiques humaines (98 %). Le clopidogrel est une pro-drogue qui nécessite des biotransformation hépatique pour être transformé en métabolite actif. Il existe principalement 2 voies métaboliques : la première médiée par des estérases, produit un dérivé acide carboxylique inactif par hydrolyse (85 % des métabolites circulants), la seconde médiée par des enzymes de la famille des cytochromes P450. Le clopidogrel nécessite 2 biotransformations avec production d'un métabolite intermédiaire (2-oxo-clopidogrel) pour aboutir au dérivé thiol actif (MAC). Ce métabolisme dépend des isoenzymes CYP3A4,

CYP2C19, CYP1A2 et CYP2B6 (figure 9) [Kazui]. Le métabolite actif thiol, qui a été isolé in vitro, se lie rapidement et irréversiblement aux récepteurs plaquettaires, inhibant ainsi l'agrégation plaquettaire [Savi 2000]. Enfin, le clopidogrel est éliminé sous environ 50 % du produit est excrété dans l'urine et 46 % dans les selles. La demi-vie du clopidogrel est d'approximativement 6 heures.

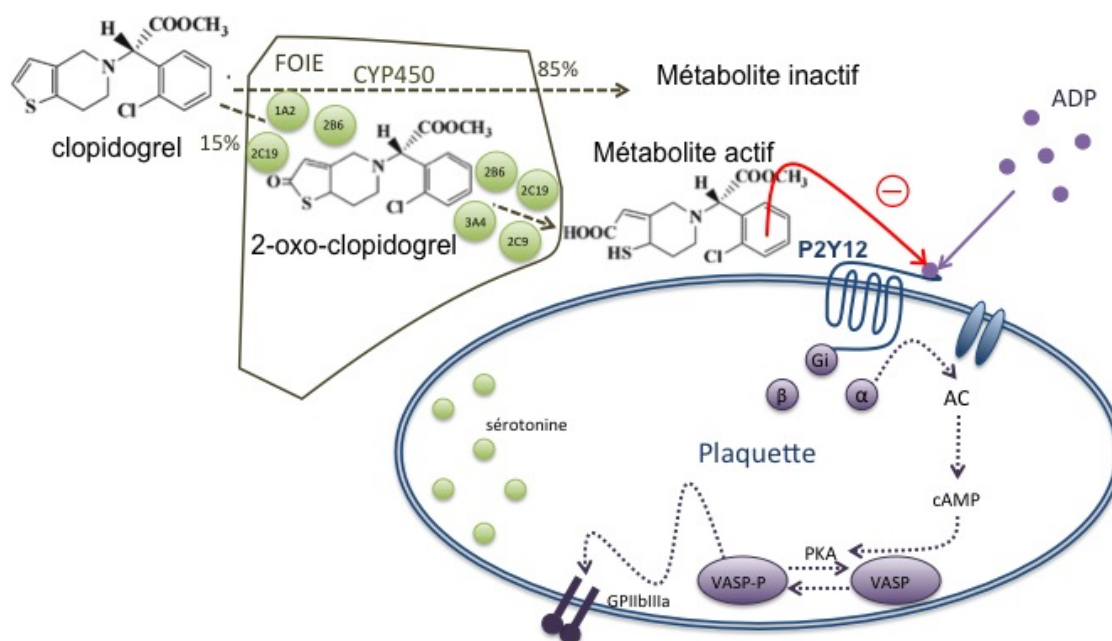


Figure 9. Mécanisme d'action du clopidogrel

1.3.2 Propriétés pharmacodynamiques

Le métabolite actif du clopidogrel inhibe sélectivement et irréversiblement le récepteur plaquettaire à l'ADP, P2Y12. Par conséquent, l'activation du complexe glycoprotéine IIb-IIIa induite par l'ADP, ne peut se faire, entraînant ainsi l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (figure 9) [Savi 2000].

Les plaquettes exposées au clopidogrel sont inhibées pour toute leur durée de vie et le retour à une fonction plaquettaire normale dépend donc du renouvellement des plaquettes. À l'état d'équilibre, le taux moyen d'inhibition associé à une dose journalière de 75 mg se situe entre 40 % et 60 %.

1.3.3 Corrélation tests de la fonction plaquettaire et effet clinique

L'efficacité du clopidogrel a largement été démontrée pour traiter les complications artérielles de l'athérosclérose. Cependant un nombre non négligeable de patients récidive sous ce traitement. A partir de ces observations cliniques, le concept de « résistance biologique » au clopidogrel a été proposé. Différentes classifications basées sur des tests de la fonction plaquettaire permettent de classer les patients comme « résistants » ou « faiblement répondeurs » ou « partiellement répondeurs ». Deux types de tests sont utilisés pour mesurer la réponse plaquettaire au traitement. Les tests spécifiques basés sur la mesure de l'état de phosphorylation de VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) qui est un effecteur intraplaquettaire spécifique de l'activation du récepteur P2Y₁₂. Les autres tests sont des tests fonctionnels basés sur la mesure de l'agrégation plaquettaire en présence d'activateur, l'ADP.

2 Les principales sources de variabilité des antithrombotiques

Les sources de variabilité des médicaments antithrombotiques sont nombreuses et concernent aussi bien la pharmacocinétique que la pharmacodynamie. On peut les classer en différentes catégories : les sources de variabilité acquises (situations et populations particulières), innées (patrimoine génétique), les interactions médicamenteuses, l'environnement mais aussi l'observance des traitements.

2.1 Les sources de variabilité acquises

En fonction des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un médicament, d'importantes variations d'exposition ou d'effet des traitements se produisent. Celles ci sont notamment en lien avec les caractéristiques démographiques des patients ou certaines situations particulières.

2.1.1 Caractéristiques démographiques

L'âge est un facteur démographique qui est une source majeure de variabilité de la réponse aux médicaments. Il est très souvent corrélé aux fonctions physiologiques des patients. La pharmacocinétique d'un médicament est différente pour les âges extrêmes de la vie. Avec le vieillissement, on note une altération de certaines fonctions physiologiques. L'absorption intestinale est ralentie par diminution de l'acidité gastrique, des sécrétions ou de la motilité digestives. Le métabolisme hépatique des médicaments est affecté par une diminution de l'activité enzymatique et du flux sanguin hépatique chez la personne âgée. Chez les nouveaux nés, l'immaturation de certaines fonctions enzymatiques peut poser des problèmes d'accumulation. La distribution est modifiée par l'état d'hydratation des personnes âgées mais aussi par la diminution de la synthèse des protéines plasmatiques. La fonction rénale est altérée chez les personnes âgées et expose ces personnes au risque d'accumulation du médicament. Dans le cas des médicaments antithrombotiques, l'âge est aussi le reflet de l'état vasculaire des patients. Plus l'âge augmente, plus le risque hémorragique et thrombotique augmente.

D'autres facteurs démographiques expliquent des variations pharmacologiques comme le poids ou le sexe des patients.

- Le fondaparinux

Les sujets âgés représentent un groupe de sujet à risque d'accumulation du fondaparinux et possèdent un risque de saignement augmenté [Turpie, Eriksson, 2002]. C'est principalement l'altération de la fonction rénale qui est en cause dans la diminution de l'élimination du fondaparinux. Chez les sujets âgés de plus de 75 ans la clairance est diminuée par 1,2 à 1,4 par rapport aux patients âgés de 65 ans.

Les patients de faible poids, inférieur à 50 kg, possèdent un risque de saignement plus important par rapport aux patients d'un poids supérieur. L'élimination du fondaparinux diminue avec la décroissance du poids des patients (9% par tranche de 10 kg) [Turpie 2009].

2.1.2 Insuffisance rénale

Elle survient lors de la diminution de la fonction rénale qui se caractérise par une réduction de l'élimination d'un certain nombre de médicaments ou de leurs métabolites. Dans le cas de médicaments éliminés sous forme inchangée dans les urines, la baisse de l'élimination entraîne l'accumulation de produit actif et expose au risque de toxicité des traitements. C'est le cas du fondaparinux qui sont contre-indiqués chez les patients insuffisants rénaux.

- Le fondaparinux

Le fondaparinux était initialement contre-indiqué à la dose de 2,5 mg/j dans la prévention de la MVTE. En effet, la clairance du fondaparinux est multipliée par 5 chez les patients avec une insuffisance rénale sévère ($\text{CrCl} < 30 \text{ mL/min}$) par rapport aux patients avec une fonction rénale normale [EMEA 2004]. La relation entre la fonction rénale, estimée par la clairance de la créatinine et l'accumulation du fondaparinux, résumée sous par l'AUC est de type exponentielle. Comparé aux patients avec une fonction rénale normale ($\text{ClCr} > 80 \text{ mL/min}$), la clairance est de 1,2 à 1,4 fois inférieure chez les patients avec une insuffisance rénale légère ($50 < \text{ClCr} < 80 \text{ mL/min}$), et en moyenne de 2 fois inférieure chez les patients avec une insuffisance rénale modérée ($30 < \text{ClCr} < 50 \text{ mL/min}$). La demi-vie d'élimination

augmente à 29 heures chez l'insuffisant rénal modéré et à 72 heures chez l'insuffisant rénal sévère, contre 21 h chez le sujet avec une fonction rénale normale.

2.1.3 Insuffisance hépatique

Le foie joue un rôle essentiel dans le métabolisme des médicaments. Toute atteinte hépatique peut s'accompagner de modifications pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Au cours de l'insuffisance hépatique, plusieurs modifications peuvent entraîner une diminution de l'élimination des médicaments. La rétention hydro-sodée augmente le volume de distribution de certains médicaments. La diminution de la synthèse des protéines plasmatique, du flux sanguin hépatique et de l'activité enzymatique abaisse la clairance des médicaments. Dans le cas des AVK, on retrouve des perturbations pharmacodynamiques associées. L'insuffisance hépatocellulaire entraîne la réduction de la synthèse des facteurs de la coagulation et renforce l'effet des AVK qui eux même s'accumulent.

2.2 Les sources de variabilité innées

La pharmacogénétique s'intéresse à l'identification des polymorphismes génétiques impliqués dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament. Un polymorphisme génétique se définit comme la présence dans la population d'une mutation avec une fréquence supérieure à 1%. L'influence de ces polymorphismes génétiques est retrouvée à toutes les étapes du devenir et de l'effet des médicaments antithrombotiques.

- Les AVK

Les dérivés coumariniques (acénocoumarol et warfarine) sont métabolisés au niveau hépatique par les systèmes enzymatiques des cytochromes P450 (CYP450) 2C9. Deux polymorphismes liés à la modification d'une seule paire de base (Single Nucléotide Polymorphism ; SNP) ont été décrits pour le gène codant pour le CYP2C9 dans l'exon 3 (CYP2C9*2) et dans l'exon 7 (CYP2C9*3). On observe que les doses administrées sont plus faibles chez patients présentant au moins un de ces SNP que chez les patients possédant les deux allèles sauvages (CYP2C9*1) [Becquemont 2008]. De plus, ces patients porteurs de SNP ont une fréquence plus élevée de saignements mineurs. Les patients variant CYP2C9*3

sont plus difficiles à équilibrer dans les six premiers mois de l'initiation du traitement [Schalekamp 2004; Schwarz 2008].

Le mécanisme d'action des médicaments AVK correspond à une inhibition de la synthèse des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants. Les AVK inhibent la vitamine K époxyde réductase (VKORC) nécessaire à la régénération de la vitamine K oxydée impliquée dans la synthèse de certains facteurs de la coagulation. Récemment, un polymorphisme du gène codant pour la sous-unité 1 de cet enzyme a été découvert [Li 2004; Rost 2004]. Parmi les SNP décrits, certains ont été identifiés comme des facteurs de sensibilité à la warfarine [Wadelius 1997; D'Andrea 2005; Geisen 2005; Rieder 2005; Sconce 2005; Yuan 2005; Lee 2006; Takahashi 2006] et à l'acénocoumarol [Bodin 2005; D'Andrea 2005].

- Le clopidogrel

Au niveau de son absorption le clopidogrel nécessite un passage par la glycoprotéine de transport P (P-gp). Un polymorphisme du gène ABCB1, codant pour cette glycoprotéine de transport est impliqué dans la variabilité pharmacocinétique du clopidogrel [Simon 2009].

Le clopidogrel possède un métabolisme hépatique important impliquant les cytochromes P450. Parmi les familles de cytochromes impliquées dans les biotransformations conduisant à la production du métabolite actif, le variant allélique 681 G>A (*2) du CYP2C19 est fréquent et contribue de façon importante à la grande variabilité interindividuelle des effets antiplaquettaires du clopidogrel. Ce polymorphisme CYP2C19*2 influe de façon significative le pronostic à long terme de patients traités par clopidogrel au long cours [Hulot 2006]. D'autre part, une relation entre l'activité du CYP3A4 et la réponse au clopidogrel a été établie [Lau 2004]. Or il existe un polymorphisme pour ce gène qui implique des modulations d'activité et pourrait par conséquent expliquer une partie de la variabilité de ce médicament.

Des polymorphismes génétiques ont aussi été décrits pour le récepteur plaquettaire du clopidogrel, P₂Y₁₂. Les porteurs de l'haplotype H2 du gène codant pour P₂Y₁₂ pourraient ainsi conserver une réponse plaquettaire augmentée malgré le traitement [Fontana 2003].

2.3 Les interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses correspondent à une modification *in vivo* inattendue de l'effet pharmacologique d'un médicament en cas de co-administration avec un autre. Certaines de ces interactions peuvent être bénéfiques en thérapeutique. D'autres, au contraire, peuvent avoir des effets néfastes et conduire à la diminution de l'activité thérapeutique ou à l'augmentation de la toxicité. Une interaction peut être pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique. Les interactions pharmacocinétiques peuvent survenir au niveau d'une des quatre étapes du devenir du médicament dans l'organisme. Les interactions médicamenteuses au niveau de la métabolisation représentent la source la plus fréquente. Les médicaments inducteurs enzymatiques augmentent le métabolisme et donc la clairance hépatique de tous les substrats de ces voies enzymatiques. A l'opposé, les inhibiteurs sont responsables d'une augmentation du risque hémorragique des anticoagulants oraux. Les interactions au niveau de l'élimination rénale sont rares et ne sont pas particulièrement étudiées avec les médicaments antithrombotiques. Les interactions médicamenteuses pharmacodynamiques se définissent par une modification de la réponse pharmacologique sans modification des concentrations plasmatiques des médicaments en cause. Par exemple, tous les médicaments antithrombotiques potentialisent l'effet d'un autre médicament antithrombotique. Les médicaments antiagrégants plaquettaire comme l'aspirine, les AINS, inhibent l'agrégation plaquettaire et donc augmentent le risque hémorragique. L'héparine aux doses thérapeutiques augmente faiblement le taux de prothrombine (TP) et donc le risque hémorragique.

- AVK

Une diminution de l'absorption des AVK par la formation de complexes en présence de cholestyramine peut être observée.

Il peut exister une compétition entre deux médicaments pour la fixation à une même protéine, celui qui a la plus forte affinité pour la protéine déplaçant la fixation de l'autre. Ainsi, les AVK fortement liés aux protéines plasmatiques sont déplacés par les salicylés à fortes doses [Bourin 1993]. En réalité ce mécanisme reste contesté. D'une part, il existe des mécanismes physiologiques de compensation. D'autre part, d'autres mécanismes d'interaction sont souvent impliqués comme par exemple une compétition avec des transporteurs.

Des inducteurs enzymatiques des CYP450 sont responsables d'une diminution de la concentration et de l'effet anticoagulant des AVK. Ils sont très nombreux. Les principaux sont

la rifampicine, la phénytoïne, la carbamazépine, les barbituriques. A l'opposé, les inhibiteurs enzymatiques sont responsables d'une augmentation du risque hémorragique des anticoagulants oraux. On peut citer l'allopurinol, les antifongiques azolés et la cimétidine.

Au niveau pharmacodynamique, Il existe de nombreux cas d'augmentation de l'activité des anticoagulants oraux rapportés chez des patients recevant un traitement antibiotique. Les antibiotiques concernés sont notamment les fluoroquinolones, les macrolides, les cyclines, le cotrimoxazole et certaines céphalosporines. Le mécanisme impliqué correspond à une diminution de la production endogène de vitamine K par destruction de la flore bactérienne intestinale. C'est le cas des antibiotiques à large spectre et des sulfamides [Udall 1965].

- Le clopidogrel

Des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques avec le clopidogrel ont été étudiées à plusieurs reprises. Elles concernaient de puissants inhibiteurs du cytochrome P450 3A4 : statines, érythromycine, kétoconazole, etc. [Lau 2006]. Le CYP 3A4 est l'un des systèmes impliqué dans la production du métabolite actif à l'origine du blocage de récepteur à l'ADP, P2Y₁₂ à l'origine de l'activité antiagrégante du clopidogrel.

Au niveau pharmacodynamique, les antidépresseurs sélectifs de la recapture de la sérotonine augmenterait le risque hémorragique [Serebruany 2006]. Il s'agit d'un effet indésirable très largement discuté dans la littérature. Le mécanisme probablement mis en jeu correspondrait à un blocage de la recapture de la sérotonine au niveau plaquettaire. La conséquence d'une telle modification est complexe, mais il existe un consensus sur une diminution de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires [Alvarez 1999; Serebruany 2001].

2.4 L'environnement

L'alimentation peut influencer l'efficacité des médicaments anti-vitamine K. Les légumes verts (comme le chou, épinards, la laitue), les abats, sont riches en vitamine K et s'opposent à l'effet des AVK, inhibiteurs de la synthèse de la vitamine K active. On retrouve aussi des inducteurs enzymatiques comme le tabac spécifiquement sur le CYP1A2 ou certaines plantes comme le millepertuis qui agissent sur le CYP3A4, CYP1A2 et CYP2C9. Ces éléments peuvent diminuer l'exposition des AVK ou du clopidogrel. Le jus de pamplemousse est lui un inhibiteur du CYP3A4.

2.5 L'observance au traitement

Le terme d'observance au traitement désigne la rigueur avec laquelle un malade adhère aux prescriptions du médecin. L'inobservance au traitement peut être responsable de l'instabilité de l'INR. Pour maintenir un INR dans la zone thérapeutique, les concentrations plasmatiques des AVK doivent être stables. Pour cela, les patients doivent être observants c'est-à-dire respecter les modalités exactes de prises du médicament. Dans les études cliniques l'inobservance est estimée entre 10 à 20% chez les patients sous anticoagulants [Arnsten 1997].

3 Les principes de la modélisation

L'objectif de la modélisation en pharmacologie est de mettre au point une représentation réaliste du devenir et de l'effet d'un médicament dans l'organisme et de prévoir les concentrations et les effets qui seront observées si les modalités d'administration ou les caractéristiques des patients varient. Dans ce type d'analyse, le phénomène biologique est modélisé selon des équations mathématiques appropriées. Classiquement, la modélisation pharmacocinétique repose sur une approche dite compartimentale. Un compartiment se définit comme un espace virtuel ou possédant une réalité anatomique (par exemple le compartiment sanguin) dans lequel une molécule présente un même comportement ou cinétique en tout point. Ainsi, l'élimination d'un médicament administré par voie intraveineuse suit une fonction exponentielle décroissante en fonction du temps. Le paramètre k est la constante de vitesse. Pour tous les modèles pharmacocinétiques linéaires, l'équation mathématique décrivant les concentrations est basée sur la somme d'exponentielles décrivant les échanges de quantité de médicament entre différents compartiments (figure 10). Le nombre de compartiments et leur enchaînement les uns par rapport aux autres sont choisis de façon à pouvoir s'adapter aux phénomènes observés. Les paramètres étudiés sont le reflet des différentes étapes pharmacocinétiques du médicament. Ils comprennent : la constante d'absorption (K_a), le volume de distribution du médicament (V_d), la clairance du médicament (Cl), le temps de demi-vie d'élimination du médicament ($t_{1/2}$).

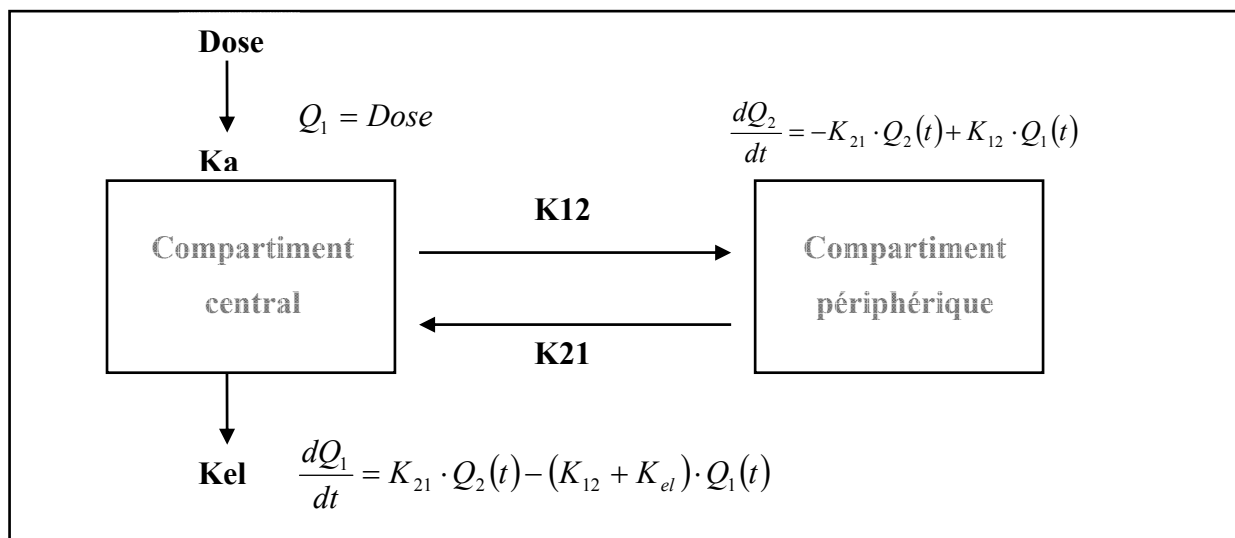


Figure 10. Représentation du modèle a deux compartiments avec une absorption orale

La résolution analytique des équations différentielles permet de connaître la concentration du médicament dans le compartiment central (qui représente le compartiment plasmatique). Dans le cas d'un modèle bi-compartimental avec administration extravasculaire l'équation intégrée s'écrit selon:

$$C(t) = A e^{-\lambda_1 t} + B e^{-\lambda_2 t} - D e^{-k_{el} t}$$

Pour modéliser les variations d'effet d'un médicament en fonction de ses concentrations, on utilisera un modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique (PK/PD) illustré par la figure 11.

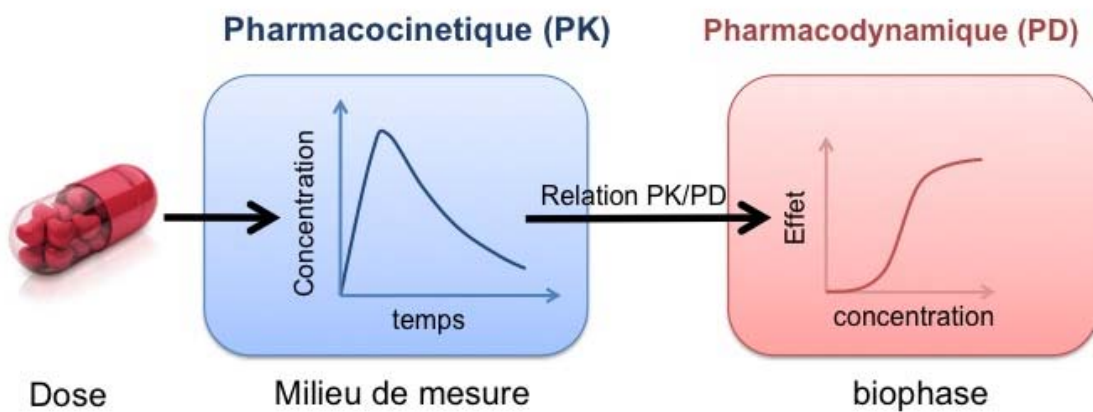


Figure 11. Relation dose/concentration/effet d'un médicament

La différence avec la méthode non compartimentale est que les paramètres ne sont pas observés mais estimés à partir du modèle mathématique, ce qui rend ce type d'analyse moins soumise aux aléas de l'observation et permet de faire des prédictions en faisant varier des paramètres comme la dose ou l'intervalle d'administration.

3.1 Estimation des paramètres moyens par la méthode standard en deux étapes

Cette méthode permet d'estimer à la fois la moyenne et la variance des paramètres du modèle entre les individus [Boeckmann 1994]. Dans la première étape, les paramètres pharmacocinétiques individuels de chaque patient sont estimés par régression non linéaire sur la base des concentrations individuelles mesurées. Dans la seconde étape, les estimations individuelles vont servir de support pour les calculs statistiques de la population. Les paramètres sont obtenus à partir du calcul de la moyenne, de la variance et de la covariance des estimations individuelles. Il s'agit d'une méthode simple qui permet de tester l'influence de covariables car le modèle ne permet pas de distinguer la variabilité inter- et intraindividuelle. Cependant, elle nécessite de disposer de nombreux prélèvements pour l'estimation des paramètres individuels. De plus, la variance est surestimée par le fait qu'elle contient à la fois la variabilité inter et intra-individuelle.

3.2 Détermination des paramètres par approche de population

La pharmacocinétique/pharmacodynamie de population consiste en l'analyse de la variabilité de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie dans une population d'individus. Cette approche présentée par Sheiner en 1977 permet d'analyser globalement les données obtenues sur un ensemble d'individus, sans différencier chacun des sujets, en tenant compte de la variabilité entre les individus [Sheiner 1977]. Cette méthode estime la moyenne et la variance des paramètres du modèle, la forme de la distribution statistique et étudie la variabilité sur chacun des paramètres, en incorporant dans le modèle des covariables. La PK/PD de population repose sur l'utilisation de modèles pharmaco-statistiques non linéaires à effets mixtes.

Cette approche permet de modéliser les différents paramètres des modèles en estimant des paramètres moyens ou paramètres de population (effets fixes), identiques pour un groupe d'individus, et des paramètres de variabilités inter-individuelles et intra-individuelles (effets aléatoires). Ainsi, pour décrire par exemple la concentration (ou l'effet) Y_{ij} mesurée chez un sujet i au temps j , on utilise le modèle suivant :

$$Y_{ij} = f(X_{ij}, \theta + \eta_i) + \varepsilon_{ij}$$

- f représente la fonction non linéaire du modèle. Elle dépend de X_{ij} qui est une matrice de covariables mesurée pour un sujet i au temps j .
- θ représente le vecteur des paramètres moyens d'effet fixe.
- η_i correspond au vecteur d'effets aléatoires qui quantifie l'écart pour le sujet i entre la moyenne et la valeur du paramètre du sujet. On suppose $\eta_i \sim N(0, \Omega)$
- ε_{ij} est le paramètre d'effet aléatoire quantifiant l'écart pour le sujet i au temps j entre la prédiction du modèle et la valeur mesurée chez le sujet. On suppose $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

Les paramètres de distribution θ , Ω et σ^2 sont estimés par des méthodes basées sur le maximum de vraisemblance. L'estimation du maximum de vraisemblance est complexe pour les modèles non linéaires à effets mixtes et plusieurs méthodes d'estimations sont proposées. Les plus courantes reposent sur une approximation par linéarisation d'ordre 1 des effets aléatoires. Ces méthodes comme FO (first order), FOCE (First Order Conditional Estimates) et Laplacienne sont implémentées dans le logiciel NONMEM [Boeckmann 1994]. La fonction objective correspondant à la qualité d'estimation est minimisée par un algorithme de type quasi-Newton. D'autres méthodes d'estimation de la vraisemblance ont été développées plus récemment et constituent une bonne alternative au problème de convergence fréquemment rencontré avec les méthodes précédentes. C'est le cas de la méthode SAEM (Stochastic Approximation Expectation Maximisation) qui associe une étape de simulation suivie d'une étape d'approximation stochastique. Cette méthode est implémentée dans le logiciel MONOLIX [Kuhn 2005].

L'approche de population permet d'estimer le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un médicament sans nécessiter un grand nombre de prélèvements par patient. Cette méthode permet d'évaluer la variabilité inter- et intra-individuelle. De plus cette approche permet d'expliquer une partie de la variabilité par des covariables.

3.3 Principe généraux de la modélisation par approche de population

La première étape de la construction d'un modèle de population consiste à déterminer la structure pharmacologique du modèle. En générale, il s'agit de décrire les concentrations et les effets d'un médicament en fonction du temps selon une structure compartimentale. Les paramètres de la structure compartimentale sont les effets fixes. Ils correspondent par exemple aux paramètres pharmacologiques du volume de distribution, de la clairance, etc du médicament.

La deuxième étape correspond au choix du modèle d'erreur. L'erreur d'un modèle correspond à la différence observée entre la valeur d'un paramètre de population et la valeur d'un paramètre pour un individu donné. L'erreur peut être décomposé en une variabilité inter et intra-individuelle. Pour chaque paramètre de population, une variabilité inter-individuelle peut être estimée et associée, le plus souvent, selon une relation de exponentielle. La variabilité intra-individuelle ou erreur résiduelle du modèle, est elle, modélisée selon différents types de variance. Par exemple le modèle à variance constante (additif), à variance non constante (proportionnel ou exponentiel), ou le modèle mixte.

La troisième étape correspond au choix du meilleur modèle. La structure (nombre de compartiments) et le type de modèle d'erreur sont déterminés selon la fonction objective du modèle, des critères d'ajustements graphiques et de la précision des estimations. Il existe une règle générale de parcimonie pour des modèles de performances équivalentes.

La dernière étape de modélisation est une étape de validation. Plusieurs stratégies sont possibles en fonction du type de données disponibles ou l'utilisation qui sera faite du modèle. On distingue la validation externe, basée sur l'utilisation d'un nouveau jeu de données qui n'a pas été utilisé pour réaliser la construction modèle population. Il s'agit d'une méthode très robuste, mais qui n'a pas toujours disponible. La validation interne repose sur des méthodes statistiques. Il existe des méthodes de ré-échantillonnage de la base de données comme le « Bootstrap », des méthodes basées sur les simulations comme le « Visual Predictive Check » ou alors les méthodes de « Splitting » qui définissent des sous-groupes d'individus au sein de la base de données.

Partie II : évaluation de la variabilité pharmacocinétique du fondaparinux dans une population non sélectionnée de patients et dans une population de patients sélectionnés insuffisants rénaux

4 Étude de la variabilité pharmacocinétique du fondaparinux dans une population de patients non sélectionnée - Etude POP-A-RIX

4.1 Introduction

4.1.1 Contexte de l'étude POP-A-RIX

Dans cette étude nous étudierons le fondaparinux (Arixtra®) dans la prévention de la maladie veineuse thromboembolique (MVTE) après une chirurgie orthopédique majeure qui se définit comme une prothèse totale de hanche ou de genou ou une fracture de hanche.

Les données d'efficacité du fondaparinux

Utilisé à la posologie de 2,5 mg une fois par jour, le fondaparinux s'avère plus efficace que le traitement de référence, l'énoxaparine, une héparine de bas poids moléculaire (HBPM) dans la prévention de la MVTE [Turpie 2003]. Dans les quatre études de phase III menées dans la chirurgie orthopédique majeure, le fondaparinux a démontré sa supériorité par rapport à l'énoxaparine [Bauer 2001; Eriksson 2001; Lassen 2002; Turpie, Bauer, 2002]. La méta-analyse de Turpie, regroupant ces 4 essais thérapeutiques, estime que le fondaparinux réduit de plus de 55% le nombre de thromboses veineuses profondes systématiquement recherchées par phlébographie (6,8% versus 13,7% ; $p < 0,001$), mais sans réduire le nombre de thromboses veineuses profondes (TVP), embolie pulmonaire (EP) symptomatiques [Turpie, Bauer, 2002]. Ces études comparatives se basent sur une dose consensuelle de fondaparinux (2.5 mg en sous-cutané 1/jour) alors que les doses d'HBPM et le mode d'administration (horaire par rapport à la chirurgie) sont différents en Europe (40 mg en SC 1 X/jour) et en Amérique du Nord (30mg en SC 2/jour) [Turpie 2001].

Fondaparinux et risque hémorragique

Cette meilleure efficacité se fait pourtant au détriment de l'augmentation significative du risque d'hémorragie majeure (2,7% versus 1,7% ; $p=0.008$) par rapport à l'énoxaparine mais sans différence sur les hémorragies graves (définition clinique) [Turpie, Bauer, 2002].

L'analyse en sous-groupe des données des études de phase III a montré que le nombre d'hémorragies était plus important lorsque le fondaparinux était administré dans un délai inférieur à 6 heures après la fin de la chirurgie. Cette analyse a également démontré que certains patients fragiles présenteraient un risque plus important de saigner. Ce groupe de patients fragiles correspond à des patients âgés de plus de 75 ans et/ou possédant un poids inférieur à 50 kg et/ou insuffisants rénaux défini par une clairance de la créatinine inférieure à 50 mL/min selon la formule de Cockcroft & Gault [Turpie 2003]. L'administration répétée de fondaparinux à doses fixes chez des patients avec de faibles poids ou une insuffisance rénale peut probablement entraîner une accumulation de ce produit conduisant potentiellement à un événement hémorragique. Il est donc légitime de se demander s'il est possible d'anticiper ce risque hémorragique avec des dosages sanguins permettant de détecter une accumulation du fondaparinux.

Corrélation entre l'activité anti-Xa et le risque hémorragique ?

La mesure de l'activité anti-Xa est un test d'hémostase qui est bien adapté à la surveillance biologique des traitements possédant une action dirigée contre ce facteur de la coagulation tel que les HBPM et le fondaparinux. Dans la précédente analyse pharmacocinétique, de hauts niveaux d'anticoagulation, mesurés par les activités anti-Xa, ont été mis en évidence [Turpie 2009]. Un modèle pharmacocinétique de population du fondaparinux a été décrit à partir de patients inclus dans des études contrôlées, randomisées de phase II et III [Eriksson 2001; Turpie 2001; Turpie, Bauer, 2002]. Il s'agit d'un modèle à 2 compartiment avec une absorption d'ordre 1 (tableau 2). Dans ce modèle, la clairance de la créatinine estimé par la formule de Cockcroft & Gault explique une partie de la variabilité de la clairance ainsi que le poids explique une partie de la variabilité du volume de distribution. Les caractéristiques de ces patients sont très différentes des patients réellement rencontrés dans la pratique clinique. En particulier, les proportions de patients âgés, avec un faible poids ou une insuffisance rénale sont différents entre les études cliniques et les études observationnelles [Rosencher 2005; Samama 2007]. Ainsi nous nous posons la question de la

pertinence d'un tel modèle pour prédire la pharmacocinétique du fondaparinux pour des patients de la pratique clinique.

Tableau 2. Paramètres pharmacocinétique du fondaparinux réalisés à partir des patients inclus dans les phases II/III

Paramètre	Valeur typique	Erreur standard	Coefficient de variation	Variabilité inter individuelle (%)
Cl (L/h)	0.0409	0.0160	39.1	24.4
CrCl _{C&G}	0.320	0.0169	5.3	
Cl (CrCl _{C&G}) = 0.0409 + 0.320 × (CrCl _{C&G} /médiane(CrCl _{C&G}) ; médiane CrCl _{C&G} = 73 mL/min				
Vc (L)	7.21	0.123	1.7	13.5
Poids (Vc)	0.0996	0.00626	6.3	-
Vc(Poids) = 7.21 + 0.0996 × (Poids – médiane (Poids) ; médiane Poids = 75 kg				
Ka (h ⁻¹)	1.58	0.184	11.6	70.9
Q (h ⁻¹)	0.145	0.0143	9.9	-
Vp (L)	17.8	3.78	21.2	138

4.1.2 Objectif de l'étude

Nous avons donc réalisé une étude de pharmacocinétique de population, chez des patients de chirurgie orthopédique majeure, recevant du fondaparinux à la dose prophylactique selon la pratique quotidienne. L'objectif était d'évaluer les profils d'activité anti-Xa et d'identifier les caractéristiques des patients pouvant expliquer cette variabilité interindividuelle et l'accumulation.

4.2 Patients et méthodes

4.2.1 Plan de l'étude

L'étude POP-A-RIX (POPulation A Risque traitée par fondaparinuX) est une étude de cohorte, prospective, non comparative, multicentrique française, de patients traités par une

dose prophylactique de fondaparinux dans la prévention de la MVTE, après une chirurgie orthopédique majeure. Les patients ont été inclus par un réseau d'investigateurs appartenant au réseau du GETHCAM (Groupe d'Étude de la Thrombose et de l'Hémostase en Chirurgie de l'Appareil locoMoteur).

4.2.2 Patients et traitement

Tous les patients majeurs, opérés pour une chirurgie orthopédique majeure et relevant d'un traitement par fondaparinux à la dose de 2,5 mg/jour en prévention de la maladie thromboembolique veineuse, pendant au moins 5 jours, étaient éligibles. Les critères d'exclusion correspondaient aux contre-indications mentionnées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP), c'est-à-dire une hypersensibilité connue au fondaparinux ou à l'un des excipients, un saignement évolutif significatif, une endocardite bactérienne aiguë et une insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine < 30ml/min).

La première dose de fondaparinux a été administrée au moins 6 h après la fin de la chirurgie, la seconde dose 12 h après la première. La durée du traitement était basée sur les recommandations internationales [Geerts 2008].

Tous les patients ont donné leur consentement oral pour participer à cette étude. La commission Informatique et Liberté (CNIL) a donné son accord pour la création d'une base de données. Cette étude a été déclarée sur le registre www.clinicaltrial.gov sous le numéro (NCT0163543).

4.2.3 Collection des données et méthode de dosage

Un à quatre prélèvements ont été collectés de façon aléatoire sur toute la durée du traitement par fondaparinux (8 à 11 jours). Les activités anti-Xa du fondaparinux ont été déterminées par différentes méthodes de dosage selon les centres (Tableau 3) [Bara 1999]. Les différents automates ont été calibrés soit en utilisant une droite de calibration réalisée avec des concentrations de fondaparinux soit en utilisant des standards d'HBPM. Les résultats des mesures d'activités anti-Xa ont été exprimés en mg/L de fondaparinux. Dans le cas d'étalonnage en HBPM une corrélation a été réalisée *a posteriori* pour exprimer les résultats en mg/L de fondaparinux. La gamme de mesure s'étendait de 0,07 à 1,5 mg/L. L'imprécision et l'erreur des méthodes de dosage étaient inférieure à 10% pour la plus faible des concentrations (0,07 mg/L).

Pour chaque patient, des données démographiques ont été recueillies : âge, poids, taille, sexe. À partir de ces données, différents indicateurs ont été calculés : l'index de masse corporel ($BMI = \text{poids}/\text{taille}^2$), la surface corporelle ($BSA = [(\text{poids} \times \text{taille})/3600]^{0,5}$). La fonction rénale a été estimée à partir de la clairance de la créatinine. Cette clairance repose sur la mesure de la créatinine sérique et de données démographiques. Elle est estimée selon la formule de Cockcroft et Gault et la formule MDRD simplifiée (Modified of the Diet in Renal Disease) [Cockcroft 1976; Levey 1999].

Tableau 3. Méthodes de dosages de l'activité anti-Xa du fondaparinux

Centre	Automate	Réactif	Calibration	Conversion
Clinique Mutualiste	STAR	Biogenic	HBPM	Aucune
CHU de St-Etienne	BCS	Biogenic	fondaparinux	1750 UI ↔ 2.5 mg
AP-HP Cochin	STAR	STA	HBPM	1 µg/ml ↔ 1.34 UI/ml
CHU de Reims	STAR	Stachrom	fondaparinux	1 µg/ml ↔ 1 UI/ml
CHU de Caen	?	?	fondaparinux	4000 UI ↔ 2.5 mg
CH Annonay	STAR	STA	fondaparinux	1750 UI ↔ 2.5 mg
CHU Rouen	STAR	Rotachrom	fondaparinux	résultats en mg/L
HCL	BCS	Biophen	fondaparinux	1750 UI ↔ 2.5 mg

4.2.4 Analyse des données

Les activités anti-Xa recueillies ont été aléatoirement divisées en deux bases de données distinctes. La première base de données, comprenant 2/3 des patients, a été utilisée pour la construction du modèle pharmacocinétique. La deuxième base, comprenant 1/3 des patients a servi à la validation du modèle. Les activités anti-Xa ont été analysées par approche de population.

4.2.4.1 Construction du modèle pharmacocinétique

Identification de la structure du modèle

Dans un premier temps, nous avons identifié la structure du modèle pharmacocinétique. Pour cela différentes structures de modèles ont été testées : 1 compartiment, 2 compartiments, absorption d'ordre-1, absorption d'ordre-0, etc. La variabilité interindividuelle de chaque paramètre a été évaluée selon une distribution log-normale décrite par l'équation suivante :

$$Cl = \theta_{Cl} \times \exp^{\eta_{Cl}}$$

Dans cette équation, Cl représente la clairance du médicament ; θ_{Cl} la valeur typique de la clairance ; η_{Cl} représente la variabilité interindividuelle. Différents modèles d'erreur (exponentiel, additif, proportionnel) ont été testés pour décrire la variabilité intra-individuelle. Nous avons utilisé la méthode FOCE avec une interaction sur eta-epsilon pour estimer les paramètres du modèle dans le logiciel NONMEM (version VI, level 2 ; ICON) [Beal 1982]. Le choix du modèle s'est fait selon i) la mesure de la fonction objective du modèle ; ii) les critères d'ajustements graphiques ; iii) la précision de paramètres. La fonction objective d'un modèle est définie par $-2 \times \text{Log}$ de la vraisemblance. Un modèle est jugé meilleur qu'un autre si la fonction objective diminue de plus de 3,84 au seuil de 5% selon une loi de χ^2 (pour 1 degré de liberté) [Sheiner and Grasela 1991]. Les critères graphiques comprennent essentiellement quatre types de graphique : les observations (OBS) versus les prédictions du modèle (PRED), les observations versus les prédictions individuelles du modèle (IPRED), les résidus pondérés (WRES) en fonction du temps et les résidus pondérés en fonction des prédictions du modèle. Les prédictions individuelles du modèle sont obtenues par estimations bayésiennes. La précision des paramètres peut être estimée par l'erreur standard (SE) du paramètre, à partir de laquelle l'intervalle de confiance peut être déterminé selon l'équation suivante :

$$IC_{90, \theta} \in [\theta - 1,96 \times SE; \theta + 1,96 \times SE]$$

$IC_{90, \theta}$ représente l'intervalle de confiance à 90% du paramètre θ qui ne doit pas comprendre la valeur 0.

Modèle final avec covariables

Dans un deuxième temps, à partir du modèle structurel précédemment défini, l'influence de différentes covariables a été testée dans le modèle. L'objectif était d'expliquer une partie de la variabilité des paramètres par une relation avec les covariables. Celles-ci ont été introduites par ordre d'importance de liaison avec un paramètre à partir des représentations graphiques. Leur introduction dans le modèle s'est faite selon deux processus :

- Pour les variables continues : Ex : $V2 = \theta_2 * (\text{poids}/\text{médiane des poids})^{0.3} * \eta_2$
- Pour les variables discrètes : Ex : $Cl = \theta_1 \times \exp \eta_1$ pour une femme

$$Cl = \theta_1 \times \theta_2 \times \exp \eta_1 \text{ pour un homme}$$

Les covariables sont conservées dans le modèle si elles diminuent de façon significative la fonction objective du modèle (-3,84 selon une loi de χ^2 , $p=0,05$), si elles améliorent les graphiques d'ajustements et si la variabilité interindividuelle d'un paramètre est diminuée. Une fois que toutes les covariables ayant une influence sont incluses dans le modèle, une étape inverse de retrait de covariables est effectuée. Les covariables sont retirées une à une du modèle. Elles sont définitivement retirées si la fonction objective n'est pas modifiée de +6,63 (loi de χ^2 , $p=0,01$). Le résultat final de cette procédure permet de déterminer le modèle final [Wählby 2001].

Évaluation du modèle

Le modèle final a été évalué selon trois stratégies différentes [Brendel 2007].

La première a consisté en une validation interne basée sur la méthode du Visual Predictive Check (VPC). Le VPC correspond à une technique statistique de simulation d'une distribution de paramètres à partir des estimations des paramètres du modèle. Mille simulations des paramètres du modèle ont été réalisées et l'enveloppe de 95% de ces simulations a été superposée aux observations [Holford 2005].

La deuxième stratégie de validation a consisté en une validation externe. Les paramètres du modèle ont été appliqués à la base de données n'ayant pas servi à la construction du modèle. Le biais et la précision des prédictions ont été estimés en calculant la moyenne des erreurs (ME) et la moyenne des erreurs au carré (MSE) [Sheiner 1981].

$$ME = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (C_{PRED} - C_{OBS})$$

$$MSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (C_{PRED} - C_{OBS})^2$$

C_{PRED} représente la concentration prédite par le modèle ; C_{OBS} la concentration observée.

La troisième évaluation du modèle a consisté en une comparaison des critères graphiques du modèle défini dans cette étude et celui précédemment décrit à partir des études de phases II/III [Turpie 2009].

4.2.5 Pourquoi un MNLEM dans l'étude POP-A-RIX

Description pharmacocinétique dans des populations particulières

Notre objectif était de définir les caractéristiques pharmacocinétiques du fondaparinux dans la prévention de la MVTE après une chirurgie orthopédique majeure. La chirurgie orthopédique majeure peut concerner toutes les classes d'âge, mais il existe une représentation importante de sujets âgés (+70 ans) et fragiles. Il est parfois difficile de réaliser des études pharmacocinétique dans ces populations extrêmes. L'invasivité des prélèvements dans les études pharmacocinétiques classiques est une limitation à la réalisation de telles études chez la personne âgée. De plus, la douleur et l'anxiété provoquées par de multiples ponctions veineuses, le volume sanguin plus faible et l'état d'hydratation limitent l'inclusion de ces patients. Il est donc indispensable d'utiliser des techniques alternatives. L'approche de population, en limitant le nombre de prélèvements (3 à 4 pour la durée de l'étude), est une bonne alternative.

Description pharmacocinétique dans la pratique clinique

Pour des raisons de temps, de coût, de faisabilité et de transposabilité des résultats, il est essentiel de réaliser ces études dans la pratique clinique quotidienne. Seule une approche pharmacocinétique basée sur un faible nombre de prélèvements et permettant également une flexibilité sur les horaires et le nombre de prélèvements, est compatible avec la pratique clinique quotidienne.

Identification des covariables

L'approche de population permet d'estimer la variabilité interindividuelle des différents paramètres pharmacocinétiques du modèle, mais aussi d'en expliquer une partie par des covariables. Grâce à l'approche de population, l'influence des différents facteurs comme les caractéristiques démographiques des patients, des facteurs environnementaux, l'état physiopathologique des patients ou leur patrimoine génétique, peut être évaluée. L'approche de population permet de déterminer la relation entre un paramètre pharmacocinétique et une variable grâce à une équation mathématique. Pour déterminer avec précision cette relation, il faut disposer d'un nombre d'individus suffisamment important pour être représentatif. Par son plan de prélèvement réduit, l'analyse par approche de population permet de limiter la quantité et le coût des dosages de médicament et diminue le temps d'analyse de ces données.

4.3 Résultats

4.3.1 Description des patients

Neuf cent quatre-vingt-dix-neuf patients ont été inclus dans l'étude POP-A-RIX. Cent quatre-vingt-dix patients ont été exclus de l'analyse pharmacocinétique en raison de l'utilisation d'une méthode de dosage inappropriée. Cette méthode de dosage utilisait une gamme de calibration en HBPM sans possibilité de réaliser une corrélation *a posteriori*. Les différentes caractéristiques des patients restants sont présentées dans le tableau 4, en tenant compte de leur répartition dans les 2 bases de données et du type de chirurgie. La moyenne d'âge de la population était de $74,1 \pm 13$ ans et 16% des patients avaient un âge supérieur à 85 ans. La plupart des patients étaient des femmes (73%). Dix pour cent des patients avaient un poids inférieur à 50 kg et 24% étaient obèses ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$). En fonction de la formule utilisée pour estimer la fonction rénale, la proportion de patients insuffisants rénaux était de 23% ($ClCr_{C\&G} < 50 \text{ mL/min}$) ou 10,1% ($ClCr_{MDRD} < 60 \text{ mL/min}$) [Cockcroft and Gault 1976; Levey 1999]. Les indications du traitement par fondaparinux étaient la prévention de la maladie veineuse thromboembolique après une chirurgie orthopédique majeure : prothèse totale de hanche (33%), prothèse totale de genou (26%) ou fracture de hanche (5%). La durée moyenne de traitement était de 8 jours.

4.3.2 Description des prélèvements

Au total 2029 activités anti-Xa ont été mesurées et utilisées pour la modélisation pharmacocinétique (Figure 12). Le nombre moyen de prélèvements par patients était de 2,5 et 65% des patients avaient au moins un prélèvement. Cent une activités ont été mesurées en dessous de la limite de quantification et exclues de l'analyse.

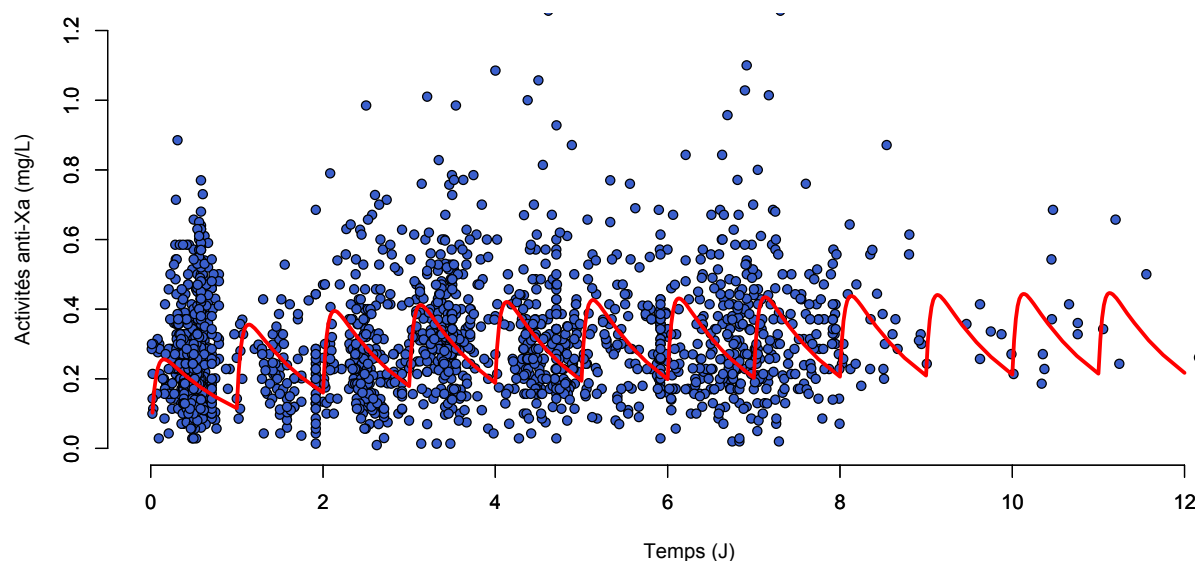


Figure 12. Description des activités anti-Xa du fondaparinux.

Les points bleus représentent les activités anti-Xa en fonction du temps de recueils ; les profils rouges représentent l'exposition pour un patient moyen avec une administration de 2,5 mg de fondaparinux toutes les 24 heures.

4.3.3 Construction du modèle

Un modèle à 2-compartiments et une absorption d'ordre-1 ont permis de décrire au mieux les activités anti-Xa du fondaparinux. Les paramètres du modèle étaient : la clairance apparente (Cl/F), le volume du compartiment central ($V2/F$), le volume apparent du compartiment périphérique ($V3/F$), la clairance apparente inter-compartimentale (Q/F) et la constante d'absorption (Ka). Une variabilité interindividuelle a été estimée pour Cl/F , $V2/F$ et $V3/F$. Un bloc de covariance a été estimé entre le Cl/F et $V2/F$.

À partir de ce modèle structurel, l'influence de différentes covariables a été évaluée. Au final, la clairance de la créatinine, le poids et l'âge des patients ont permis d'expliquer une partie de la variabilité de la clairance d'élimination du fondaparinux (Cl/F). La formule de

MDRD simplifiée a permis d'obtenir une description plus précise de la relation avec la clairance du fondaparinux que la formule de Cockcroft et Gault. D'autres covariables ont permis d'améliorer significativement les prédictions du modèle. C'est le cas du poids sur le volume de distribution (V_2/F). L'inclusion des 3 covariables (âge, poids, $ClCr_{MDRD}$) dans le modèle a diminué la fonction objective de -5003 à -5136. La variabilité interindividuelle de la Cl/F a diminué de 51 à 43% et celle du V_2/F de 39,5 à 32,8%. Les paramètres finaux du modèle, ajustés à l'ensemble de la base de données sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 4. Caractéristiques démographiques et cliniques de la population

	Prothèse totale de hanche	Prothèse totale de genou	Fracture de genou	Autres	Total	Base de construction	Base de validation
Nombre de patients	226	173	360	50	809	566	243
% de femme	59	73	83	60	73	75	68
Poids (kg)	75.2 [45 – 172]	78 [40 – 130]	60.6 [35 – 120]	75 [45 – 130]	69.4 [35 – 172]	69.6 [35 – 172]	69 [35 – 120]
% patients avec poids < 50 kg	7.5	3.5	29.3	6.1	10.5	10.1	11.5
Âge (année)	68 [27 – 89]	70.5 [19 – 89]	81.2 [43 – 100]	63.5 [69 – 95]	74.1 [19 – 100]	74.4 [19 – 99]	73.5 [28 – 100]
% de patient avec âge > 85 ans	3.5	0.6	42.5	6	16.2	15.2	18.5
BSA (m ²)	1.9 [1.4 – 2.6]	1.9 [1.3 – 2.6]	1.6 [1.2 – 2.3]	1.9 [1.4 – 2.4]	1.8 [1.2 – 2.6]	1.76 [1.2 – 2.3]	1.76 [1.2 – 2.6]
BMI (kg/m ²)	27.5 [15.8 – 54]	29.5 [17 – 49.3]	23.2 [13 – 50.6]	27.3 [18.7 – 54]	26.3 [13 – 54]	26.4 [13 – 54]	26 [15 – 50]
% patients avec un BMI > 30	24.8	42.9	10.1	24.4	24	24	24
Créatinine sérique (μmol.L ⁻¹)	76.2 [43 – 205]	76.4 [42 – 139]	70.6 [36 – 171]	75.2 [37 – 114]	71.5 [36 – 205]	71 [36 – 171]	72.7 [43 – 205]
CrCl _{MDRD} (mL.min ⁻¹)	91.5 [28.2 – 198.8]	86.2 [39.2 – 136.2]	89.1 [26.9 – 247.6]	92.4 [46 – 151]	89.9 [26.9 – 247.6]	89.5 [26.9 – 247.6]	91 [28.2 – 200.2]
% patient avec CrCl _{MDRD} < 60	8.8	7.5	11.9	12	10.1	9.8	10.8
CrCl _{C&G} (mL.min ⁻¹)	87.6 [26.3 – 208.6]	85.3 [34.5 – 163.4]	59.7 [18.6 – 162.6]	91.7 [23 – 200.6]	75 [18.6 – 208.6]	75 [20 – 208.6]	74.2 [18.6 – 200.6]
% patients CrCl _{C&G} < 50	10.6	6.4	41.1	12	23.4	22.3	25.9

Tableau 5. Paramètres pharmacocinétiques du fondaparinux

Paramètres	Valeur [95% IC]	VII CV% [95% IC]
Ka (h ⁻¹)	0.716 [0.514 – 0.917]	0 FIX
Cl (L.h ⁻¹) = $\theta 1 \times (\text{poids}/68)^{\theta 2} \times (\text{CrCl}/87)^{\theta 3} \times (\text{Age}/74)^{\theta 4}$		41.8 [37.3 – 45.9]
$\theta 1$	0.278 [0.249 – 0.306]	
$\theta 2$	0.534 [0.37 – 0.697]	
$\theta 3$	0.532 [0.381 – 0.682]	
$\theta 4$	-0.461 [-0.646 – -0.275]	
V2 (L) = $\theta 5 \times (\text{poids}/68)^{\theta 6}$		38.5 [31.5 – 44.4]
$\theta 5$	8.14 [7.7 – 8.57]	
$\theta 6$	0.522 [0.347 – 0.696]	
Q (L.h ⁻¹)	0.082 [0.052 – 0.111]	0 FIX
V3 (L)	15.6 [-0.7 – 31.9]	239.1 [116.4 – 317.6]
σ^2 additif (mg/L)	0.00123 [0.0008 – 0.0016]	
σ^2 proportionnel (CV%)	0,0421 [17 – 22]	
<i>[95% IC]: Intervalle de confiance à 95% ; σ^2: variance résiduelle, VII: Variabilité interindividuelle</i>		

Les équations suivantes décrivent la façon dont les covariables ont été intégrées dans le modèle final :

$$CL / F = 0,278 \times \left(\frac{\text{Poids}}{68} \right)^{0,534} \times \left(\frac{\text{CrCl}}{87} \right)^{0,532} \times \left(\frac{\text{Age}}{74} \right)^{-0,661}$$

$$V2 / F = 8,14 \times \left(\frac{\text{Poids}}{68} \right)^{0,522}$$

À partir de ces équations, on estime que la clairance du fondaparinux est diminuée de 25% pour les patients insuffisants rénaux modérés ($30 < \text{ClCr}_{\text{MDRD}} < 60$ mL/min) et de 43% pour les patients insuffisants rénaux sévères ($\text{ClCr}_{\text{MDRD}} < 30$ mL/min). La clairance est également diminuée de 15% pour les patients de faible poids (poids < 50 Kg) et de 7% chez les patients âgés (âge > 85 ans).

4.3.4 Évaluation du modèle

4.3.4.1 Validation interne

Les graphiques d'ajustement du modèle sont présentés Figure 13. Les relations entre les OBS versus PRED et OBS versus IPRED démontrent le bon ajustement du modèle et l'absence de biais. Le graphique WRES versus temps ou versus PRED ne montrent pas de tendance particulière. Les WRES sont bien distribués autour de 0.

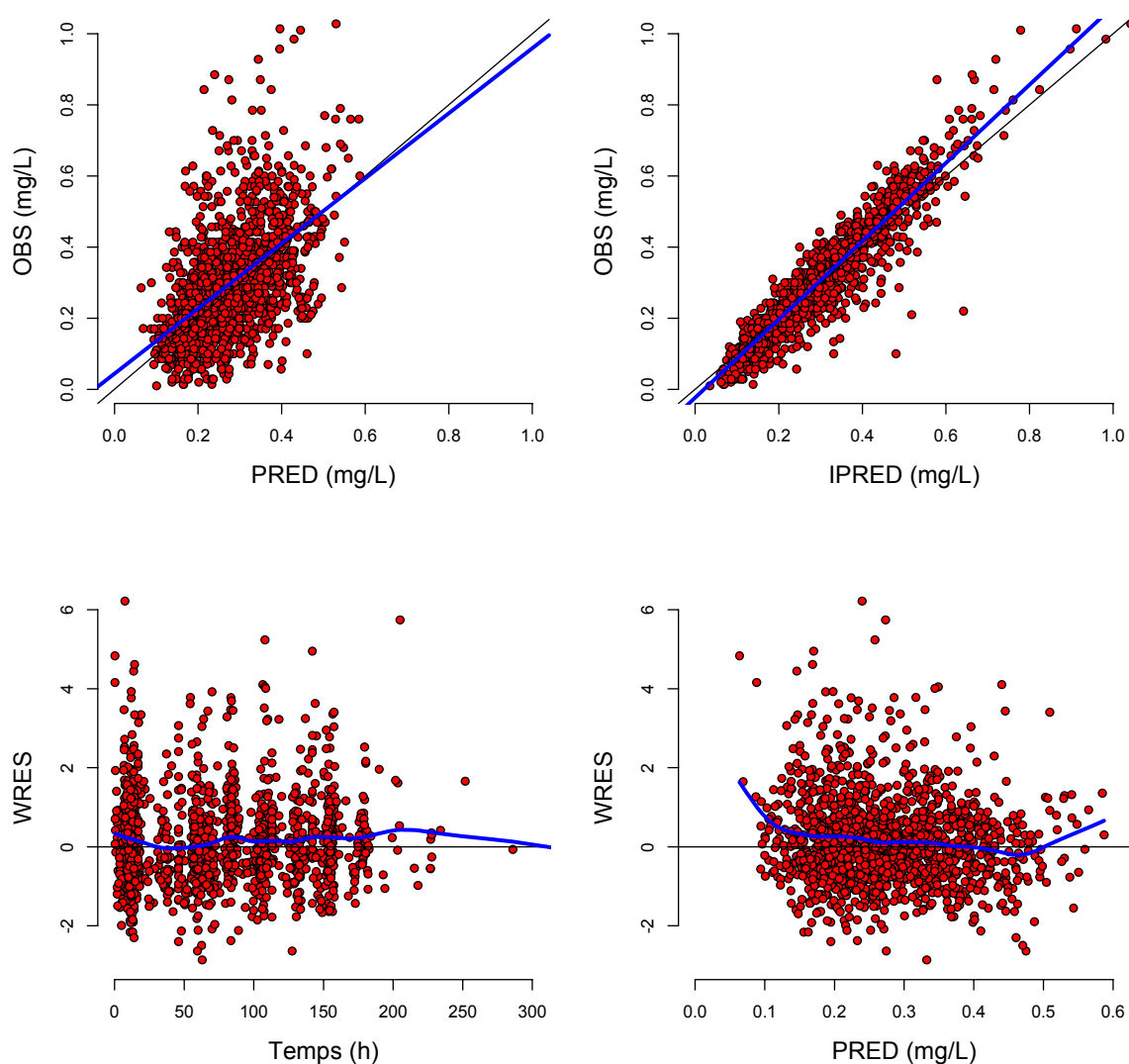


Figure 13. Graphiques d'ajustement du modèle aux données

OBS représente les observations ; *PRED* les prédictions du modèle ; *IPRED* les prédictions individuelles du modèle ; *WRES* les résidus pondérés du modèles

Le résultat du VPC est présenté Figure 14. La majorité des données est bien présente dans l'intervalle de 95% des simulations réalisées à partir du modèle final.

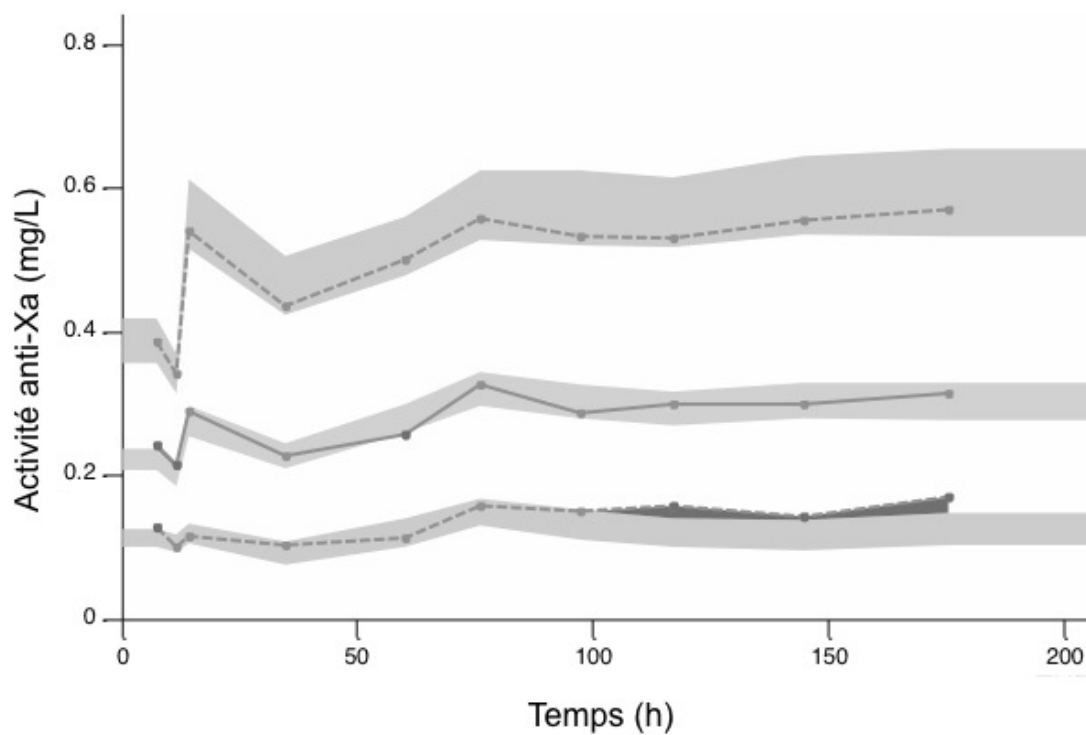


Figure 14. Visual Predictive Check.

Les lignes noires représentent le 5, 50, et 95 quantile des observations. Les surfaces grises représentent l'intervalle de confiance des simulations pour les quantiles correspondants.

4.3.4.2 Validation externe

La moyenne des erreurs de prédictions -0.029 est proche de 0 et démontre la bonne performance du modèle sur des données n'ayant pas servi à l'analyse. La précision du modèle est de 0.021.

La figure 15 illustre la performance du modèle final de POP-A-RIX ainsi que les performances d'un modèle précédemment développé à partir des résultats de patients inclus dans des études de phase II/III. Le modèle développé à partir des études de phase II/III possède un biais plus important par rapport à celui de POP-A-RIX. Il existe une surestimation des activités anti-Xa pour les valeurs hautes et une sous-estimation pour les valeurs basses.

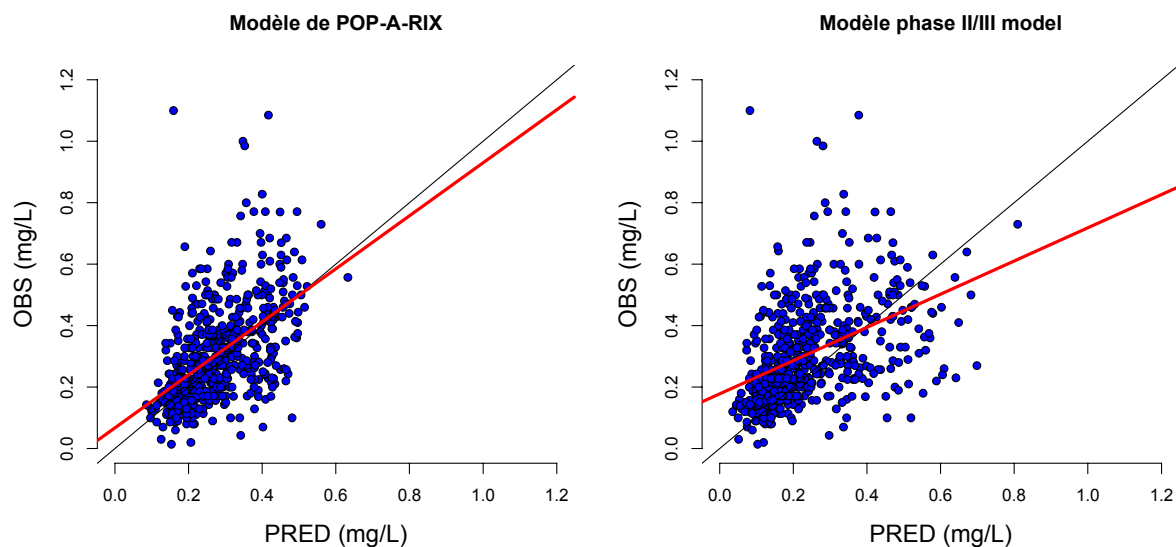


Figure 15. Validation externe.

Comparaison des prédictions et des observations de la base de données de validation des modèles POP-A-RIX et celui développé à partir des phases II/III.

4.4 Apports des modèles non linéaires à effets mixtes dans l'étude POP-A-RIX

L'utilisation des modèles non linéaires à effets mixtes dans cette étude nous a permis de décrire le modèle pharmacocinétique des activités anti-Xa du fondaparinux dans la pratique clinique quotidienne. Moins de 3 prélèvements ont été réalisés chez 809 patients et répartis de façon aléatoire sur une durée de 12 jours. Le modèle de population du fondaparinux décrit a permis d'expliquer en partie la variabilité interindividuelle de ce médicament.

4.4.1 Simulations

Le modèle de POP-A-RIX a également servi de base pour réaliser différentes simulations. L'objectif était de comprendre comment et dans quel type de population le fondaparinux peut s'accumuler et pourrait permettre de proposer des adaptations posologiques à condition de définir la zone thérapeutique de ce médicament.

à partir des paramètres du modèle final des concentrations de fondaparinux ont été simulées chez 5000 patients dont les caractéristiques démographiques (âge, poids, $\text{CrCl}_{\text{MDRD}}$) variaient de façon aléatoire entre à partir des distributions observées dans l'étude POP-A-RIX

(moyenne, écart-type, minimum, maximum). Les caractéristiques démographiques de recevant 2,5 mg et 1,5 mg (dose recommandée chez les patients insuffisants rénaux) par jour pendant 7 jours ont été simulées.

Six groupes de patients ont également été constitués pour évaluer l'exposition du fondaparinux pendant 7 jours à la dose de 2,5 mg/j. Les caractéristiques de ces groupes de patients correspondent à des patients insuffisants rénaux ($\text{ClCr} < 60 \text{ mL/min}$) ; des patients avec une fonction rénale normale ($\text{ClCr} > 60 \text{ mL/min}$) ; des patients âgés (âge > 85 ans) et des patients non âgés (âge < 85 ans) ; des patients avec un faible poids (poids $< 50 \text{ kg}$) et des patients avec un poids normal (poids $> 50 \text{ kg}$). Les caractéristiques pharmacocinétiques de chaque groupe après 7 jours de traitement ont été résumées par l'aire sous la courbe (AUC_{j7}) la concentration maximale (Cmax_{j7}) et la concentration résiduelle (Cmin_{j7}). Les moyennes géométriques de chacun des paramètres ont été comparées pour chaque groupe en utilisant un test de rang de Wilcoxon prenant en compte la correction de Bonféronni pour définir les seuils statistiques.

Des simulations de différents profils d'exposition du fondaparinux ont également été réalisées pour illustrer les propriétés du modèle pour des patients particuliers : un patient représentatif traité pour une chirurgie de remplacement de la hanche ; un patient représentatif non fragile traité pour prothèse totale de genou ; un patient représentatif traité après une fracture de la hanche par 2,5 mg/j ; un patient représentatif traité après une fracture de la hanche par 1,5 mg/j.

Résultats des simulations

Nous avons évalué les profils pharmacocinétiques des patients insuffisants rénaux, des patients avec un faible poids et des patients très âgés et nous les avons comparés à ceux de patients avec une fonction rénale normale, de patients qui n'avaient pas un faible poids et ceux de patients qui n'étaient pas âgés (figure 16). Les simulations ont mis en évidence que la moyenne des AUC_{j7} , comme critère d'exposition globale, augmente de manière significative de 34% chez les patients insuffisants rénaux, de 41% pour les patients avec un faible poids et de 9% chez les patients âgés par rapport à leur comparateur. La moyenne des concentrations résiduelles, comme reflet de l'accumulation du fondaparinux, était augmentée de 56% chez les patients insuffisants rénaux, de 63% chez patients avec un faible poids et de 16% chez les patients âgés. La concentration maximum était augmentée de 24%, 29% et 6% dans ces 3 groupes de patients.

La relation entre la concentration résiduelle et la clairance à la créatinine ou avec le poids a également été évalué par simulation et les résultats présentés figure 17. L'intervalle des activités anti-Xa prédites chez les patients insuffisants rénaux ou avec un faible poids recevant 1,5 mg de fondaparinux pendant 7 jours est comparable à l'intervalle pour les patients non insuffisants rénaux ou avec un poids normal recevant 2,5 mg de fondaparinux.

Différents profils de concentrations ont été simulés pour des patients typiques des quatre types de chirurgies. La figure 18 représente un patient typique de la prothèse totale de hanche (âge 68 ans ; poids 75 kg ; $ClCr_{MDRD}$ 50 mL/min), un patient typique de la prothèse totale de genou (âge 60 ans; poids 90 kg ; $ClCr_{MDRD}$ 100 mL/min) et un patient typique de la fracture de hanche (âge 90 ans; poids 50 kg ; $ClCr_{MDRD}$ 70 mL/min) recevant 2,5 et 1,5 mg de fondaparinux.

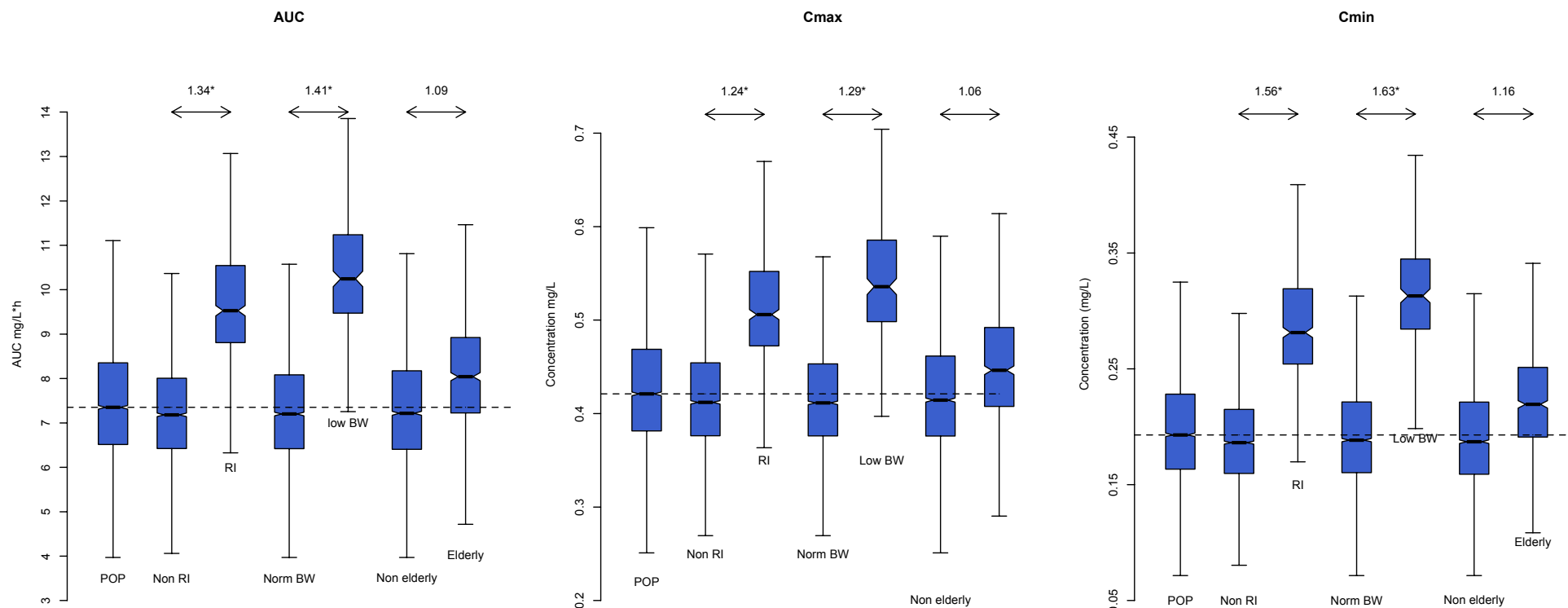


Figure 16. Prédiction de l'exposition après 7 jours de traitement par fondaparinux

AUC, Cmax, Cmin représentent les simulations après 7 jours de traitement par 2,5 mg de fondaparinux. *RI* représente les insuffisants rénaux ($ClCr_{MDRD} < 60$ mL/min) ; *BW* représente les patients avec un poids < 50 kg ; *Elderly* représente les patients avec un âge > 85 ans.

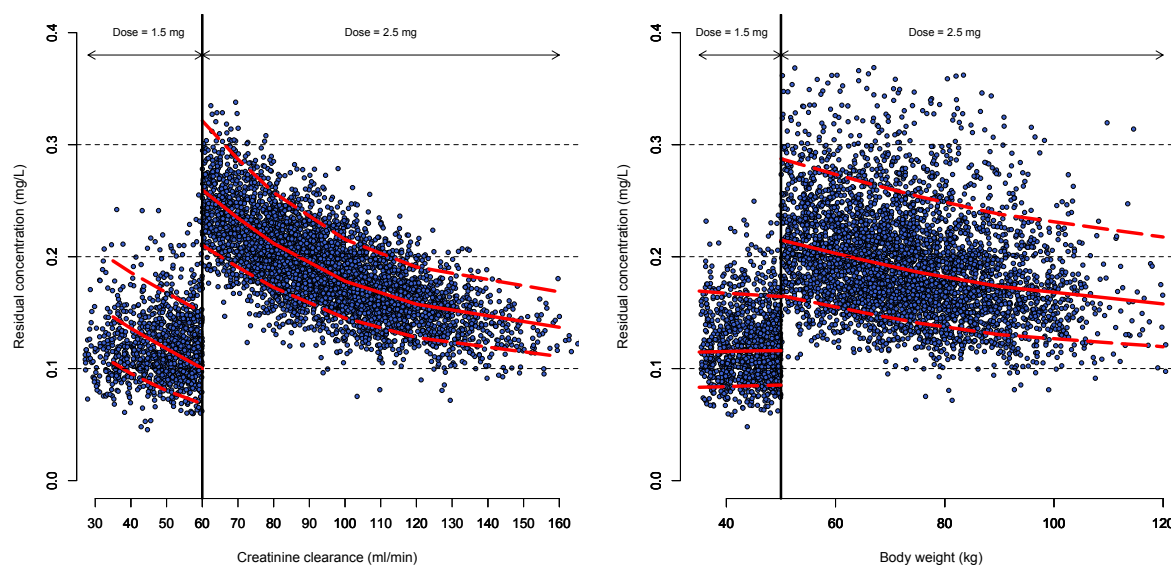


Figure 17. Concentrations résiduelles individuelles prédites.

Concentrations résiduelles prédites après 7 jours de traitements pour des patients avec une $ClCr_{MDRD}$ entre 30 et 60 mL/min ou poids compris entre 35 et 50 kg, recevant 1,5 mg de fondaparinux par jour ou patients avec une $ClCr_{MDRD}$ supérieure à 60 mL/min ou un poids supérieur à 50 kg recevant 2,5 mg de fondaparinux par jour.

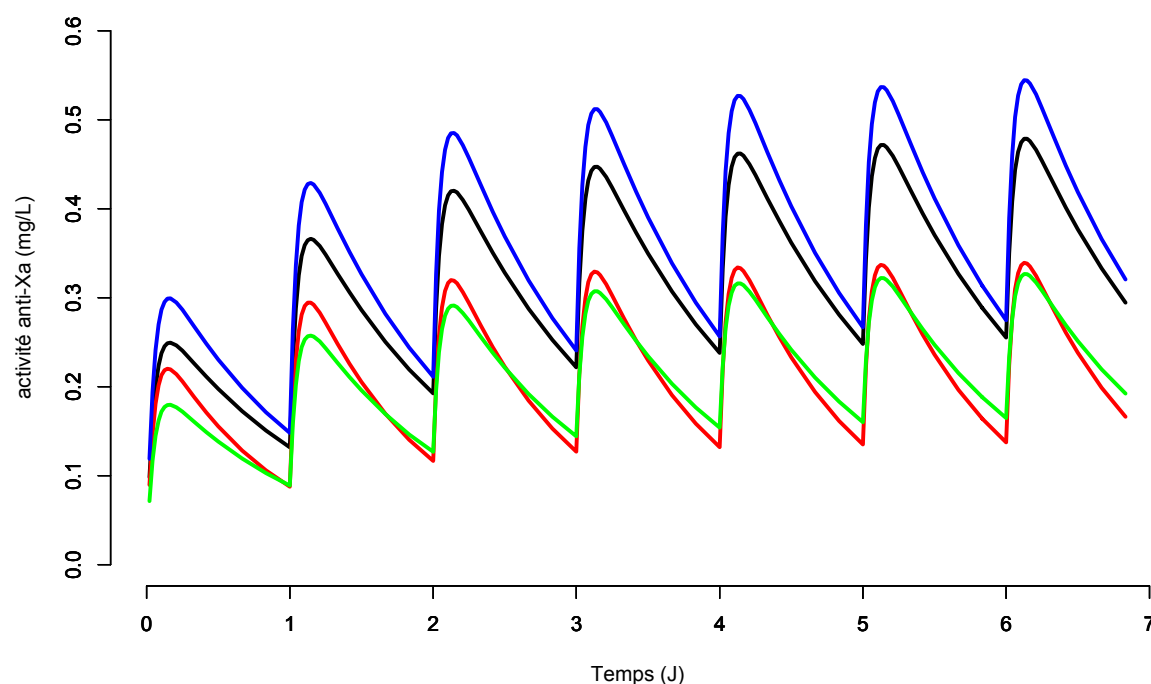


Figure 18. Simulations de l'exposition au fondaparinux pour 4 patients typiques

Le profil rouge représente un patient typique de la chirurgie du genou ; le profil noir représente un patient typique de la chirurgie de prothèse totale de hanche ; les profils bleu et vert représentent un patient typique de chirurgie de la fracture de hanche pour 2,5 mg/j (bleu) et 1,5 mg/j (vert) de fondaparinux.

4.4.2 Estimations individuelles bayésiennes

Bien que l'on ne dispose que de données éparses et recueillies de façon aléatoire, il est possible de réaliser une estimation des concentrations ou de paramètres pharmacocinétiques d'intérêt ($t_{1/2}$ vie, volume de distribution) pour chacun des individus. L'estimation des paramètres pharmacocinétiques individuels repose sur l'utilisation d'un estimateur bayésien. À partir d'une information a priori, issue du modèle de population, et d'informations individuelles issues des concentrations mesurées chez un individu, on maximise la densité de probabilité a posteriori d'obtenir un jeu de paramètres pour cet individu. L'évaluation de la distribution a posteriori des paramètres est rendue possible grâce aux méthodes de Monte-Carlo par Chaînes de Markov (MCMC). À partir des paramètres pharmacologiques individuels, il devient très simple d'estimer les profils de concentration ou d'effet pour un individu et de proposer des adaptations de traitement sur les bases de simulations.

Description des activités anti-Xa

À partir des estimations bayésiennes des paramètres pharmacocinétiques de chaque patient, nous avons estimé les paramètres pharmacocinétiques. La moyenne des C_{max} était de 0,5 [0,19 – 1,16] mg/L, 10% des patients avaient un pic de concentration supérieur à 0,7 mg/L. La moyenne des C_{min} était 0,29 [0,08 – 0,84] mg/L, 8,2% des patients avaient une concentration résiduelle supérieure à 0,4 mg/L. La moyenne des demi-vies du fondaparinux était de 28,9 [12 – 58] h, dont 5,8% des patients avaient une demi-vie supérieure à 34 h. Ces données relatives à la demi-vie sont relativement éloignées des 21 h observées chez les personnes âgées incluses dans les études pharmacocinétiques des phases de développement [Bauer 2001; Eriksson 2001; Turpie 2001; Lassen 2002].

Par la suite, les données pharmacocinétiques individuelles (C_{max} , AUC, C_{min} , $t_{1/2}$) seront testées avec d'autres variables cliniques dans un modèle multivarié pour permettre de prédire le risque hémorragique (travail en cours).

4.5 Discussion sur les résultats de l'étude

L'étude POP-A-RIX a permis de développer le premier modèle pharmacocinétique de population du fondaparinux administré à une dose prophylactique, dans une cohorte prospective de patients non sélectionnés, issus de la pratique clinique habituelle. Les caractéristiques démographiques des 809 patients inclus sont similaires à celles rapportées par les études observationnelles en chirurgie orthopédique, ce qui démontre la bonne représentativité des inclusions [Rosencher 2005; Samama 2007]. De plus, la grande dispersion des caractéristiques démographiques a permis d'évaluer avec précision leur influence sur la variabilité pharmacocinétique du fondaparinux.

Le meilleur modèle pour décrire la pharmacocinétique du fondaparinux était un modèle à 2 compartiments avec une absorption d'ordre-1. Les covariables qui ont permis d'expliquer une partie de la variabilité étaient le poids, l'âge et la clairance de la créatinine estimée selon la formule du MDRD. La relation entre la fonction rénale et la pharmacocinétique du fondaparinux était attendue compte tenu des propriétés pharmacocinétiques de ce médicament [Donat 2002]. En effet, il n'est pas métabolisé au niveau hépatique et est directement éliminé sous forme inchangée dans les urines [Donat 2002]. Dans notre modèle, la clairance du fondaparinux diminue de 25% chez les patients avec une insuffisance rénale modérée ($\text{ClCr} < 60 \text{ mL/min}$) et de 43% pour les patients avec une insuffisance rénale sévère ($\text{ClCr} < 30 \text{ mL/min}$). Il faut souligner que la meilleure formule pour estimer la clairance de la créatinine, ainsi que la relation avec la clairance d'élimination du fondaparinux, est celle du MDRD simplifiée plutôt que celle de Cockcroft et Gault. Cela s'explique probablement par le nombre important de patients âgés (Table 2). En effet la formule du MDRD simplifiée s'avère moins biaisée pour estimer la clairance de la créatinine chez les personnes âgées [Fehrman-Ekholm 2004]. Une telle observation a déjà été faite dans l'étude de la pharmacocinétique de l'énoxaparine chez des patients de plus de 75 ans [Berges 2007]. La deuxième covariable permettant d'expliquer une partie de la variabilité était le poids. Pour les patients avec un poids inférieur à 50 kg, la clairance du fondaparinux diminue de 15% et le volume de distribution de 15%.

Les différentes procédures d'évaluation du modèle réalisées ont démontré sa bonne performance pour prédire les observations. Notre modèle plus complexe estime mieux les données observées que celui précédemment décrit à partir de données recueillies dans les phases II/III du développement du fondaparinux [Turpie 2009]. Comme le montre la

figure 15, ce dernier modèle surestime les valeurs élevées d'activité anti-Xa et sous-estime les faibles niveaux d'activité anti-Xa. La raison de cette disparité entre les modèles n'est pas évidente. Elle pourrait être due à la différence observée entre les caractéristiques démographiques des patients inclus dans ces différents types d'études. En effet la distribution des âges, des poids et des fonctions rénales est réduite pour les essais cliniques de phase II/III et ne permet pas de mettre en évidence les véritables relations entre les covariables et les différents paramètres pharmacocinétiques. Les disparités observées pour ces deux modèles peuvent aussi s'expliquer par la façon dont sont implémentées les covariables dans le modèle. Dans la première description du modèle du fondaparinux, la variabilité de la clairance du fondaparinux était expliquée en partie par la clairance de la créatinine estimée par la formule de Cockcroft et Gault. Or cette formule introduit une autocorrélation de certaines données démographiques. Dans notre modèle nous avons utilisé la formule du MDRD simplifiée pour estimer la clairance de la créatinine afin d'éviter les corrélations et ainsi estimer avec plus de précision la vraie relation entre la covariable comme l'âge et le poids et les paramètres pharmacocinétiques. Notre étude pose donc la question de l'utilisation des approches de population, basées sur des études randomisées contrôlées lors du développement du médicament, pour prédire avec précision les expositions d'un médicament dans des populations particulières.

Des simulations ont été réalisées pour évaluer l'influence de la fonction rénale, du poids et de l'âge et les conséquences sur l'accumulation de l'utilisation d'une dose fixe de 2,5 mg de fondaparinux dans une population non sélectionnée. Après sept jours de traitement par fondaparinux, la concentration maximale, le concentration résiduelle et l'aire sous la courbe augmenteraient de 25% à 56% pour les patients insuffisants rénaux modérés à sévères ou avec un faible poids. L'âge n'a pas d'influence significative sur ces mêmes paramètres. Ceci était attendu étant donné la faible influence de l'âge sur la clairance du fondaparinux. Ces différentes simulations nous montrent qu'une dose unique de 2,5 mg de fondaparinux entraîne une accumulation dans deux populations fragiles : les insuffisants rénaux et les patients avec un faible poids. Cette accumulation pourrait expliquer une partie de l'augmentation du risque hémorragique, dans ces mêmes populations, au cours des études cliniques réalisées en prophylaxie de la MVTE après une chirurgie orthopédique majeure. De plus, la faible augmentation du risque hémorragique avec l'âge des patients ne contredit pas nos résultats. Le fondaparinux peut s'accumuler avec l'âge, car la fonction rénale et le poids diminuent également.

Pour réduire l'accumulation du fondaparinux dans les populations à risque, nous pouvons proposer soit de réduire les doses soit d'augmenter les intervalles d'administrations. Les simulations ont montré que les plus grandes différences observées concernent la concentration résiduelle. Ce paramètre est le reflet de l'accumulation du traitement. Des simulations de concentrations résiduelles ont été réalisées dans les populations à risque d'accumulation. Les résultats montrent que la concentration résiduelle, au septième jour de traitement par 1,5 mg de fondaparinux, chez des patients avec une insuffisance rénale modérée ou avec un faible poids, sont plus faible que chez les patients avec une fonction rénale normale ou un poids normal recevant 2,5 mg de fondaparinux (figure 16). De plus, les expositions prédites pour une dose de 1,5 mg chez des patients âgés avec une insuffisance rénale modérée ou un faible poids sont proches des expositions des patients « normaux ». Ces résultats démontrent que l'adaptation de dose préconisée par les autorités réglementaires n'est pas aussi simple pour une si grande diversité de patients.

En conclusion, cette étude de pharmacocinétique de population montre que le poids et la fonction rénale expliquent une partie de la variabilité du fondaparinux. Un poids inférieur à 50 kg ou une insuffisance rénale modérée augmente l'exposition de ce médicament. La relation entre exposition au fondaparinux et les événements cliniques n'est, à ce jour, pas démontrée. La relation événement hémorragique et exposition doit être évaluée avant toute recommandation d'adaptions posologiques. De plus, cette réduction de dose ne doit pas se faire au détriment de l'efficacité du traitement.

5 Etude de la variabilité du fondaparinux dans la prévention de la MVTE après une chirurgie orthopédique majeure dans une population de patients insuffisants rénaux - Etude PROPICE

5.1 Introduction

5.1.1 Contexte

Le fondaparinux a été évalué dans la prévention de la MVTE après une chirurgie orthopédique majeure, prothèse totale de hanche, prothèse totale de genou et fracture de la hanche [Bauer 2001; Eriksson 2001; Lassen 2002; Turpie, Bauer, 2002]. A la posologie de 2,5 mg par jour pendant 7 à 10 jours, le fondaparinux comparé à une HBPM, l'énoxaparine, permet de réduire de façon significative le risque thrombotique veineux systématiquement recherché par phlébographie mais au détriment de l'augmentation du risque hémorragique majeur [Turpie, Bauer, 2002]. Afin d'évaluer l'excès du risque hémorragique associé à la prescription de fondaparinux en prophylaxie, l'analyse en sous groupe précédemment citée a permis de déterminer que l'horaire de la première injection, le poids, l'âge et la fonction rénale étaient prédictifs de ce risque [Turpie, Eriksson, 2002]. Bien qu'il ne s'agisse que d'analyses en sous groupe, ces résultats sont à l'origine de précautions d'emploi pour l'utilisation de fondaparinux à la posologie de 2,5 mg par jour chez les patients insuffisants rénaux, de faible poids ou âgés.

Le fondaparinux est un médicament éliminé sous forme inchangée majoritairement par voie rénale (environ 80%) [Donat 2002]. Il n'est donc pas surprenant d'observer l'augmentation du risque hémorragique chez les patients insuffisants rénaux modérés avec une clairance de la créatinine comprise entre 30 et 50 mL/min du fait de l'accumulation du fondaparinux qui en résulte, confirmé dans l'étude POP-A-RIX [Delavenne, Zufferey, 2010]. Ce risque est déjà connu et a été partiellement pris en compte dans la contre-indication du fondaparinux chez les patients avec une insuffisance rénale sévère ($\text{ClCr} < 30 \text{ mL/min}$), dès le début du développement du médicament. De plus, il n'est pas surprenant de constater qu'une

posologie fixe (2,5 mg/j) sans adaptation aux poids des patients s'accompagne d'un risque hémorragique plus élevé chez les patients avec un faible poids par rapport aux patients ayant un poids normal (>50 kg). L'âge est aussi impliqué dans le risque hémorragique mais de façon moins importante car une partie du risque est déjà pris en compte par la fonction rénale et le poids des patients qui diminuent avec l'âge.

La fonction rénale peut être estimée par la clairance de la créatinine. Il existe essentiellement deux estimateurs simples pour estimer la clairance de la créatinine : la formule de Cockcroft et Gault et la formule du MDRD simplifiée [Cockcroft and Gault 1976; Levey 1999]. A la différence de la formule du MDRD simplifiée, la formule de Cockcroft et Gault implique le poids des patients pour estimer la clairance de la créatinine. Cette dernière formule, bien que moins performante pour estimer l'accumulation du fondaparinux dans les populations extrêmes, semble être un bon estimateur du risque hémorragique [Hall 1999; Segev 2005]. Cette formule est également à l'origine de simulations pharmacocinétiques qui ont été effectuées pour déterminer la dose permettant de réduire l'accumulation du fondaparinux chez les patients insuffisants rénaux.

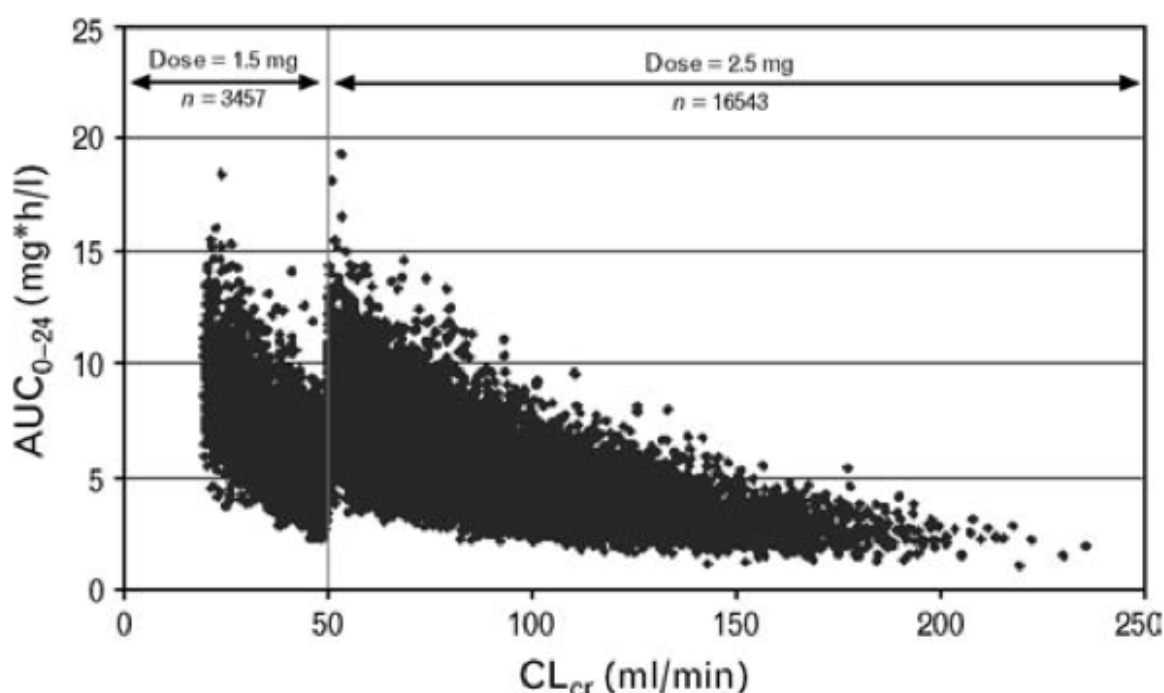


Figure 19. Simulations réalisées à partir du modèle pharmacocinétique du fondaparinux développé à partir des patients inclus dans les phases II/III

Ces simulations ont été effectuées à partir du modèle pharmacocinétique de population du fondaparinux réalisé à partir des patients inclus dans les phases II et III du développement.

L'objectif des simulations était de définir une dose de fondaparinux pour laquelle l'exposition des patients insuffisants rénaux était identique à celle des patients avec une fonction rénale normale (2,5 mg/j) [Turpie 2009]. Les simulations présentées en figure 19 montrent que les concentrations sont proches pour une posologie de 1,5 mg /j pour des patients avec une clairance de la créatinine comprise entre 20 et 50 mL/min à celles des concentrations obtenues pour 2,5 mg de fondaparinux chez des patients avec une fonction rénale supérieure à 50 mL/min. Le choix de cette posologie de 1,5 mg/j était également soutenu par le fait que cette posologie avait déjà été testée dans des études de phases II du développement [Turpie 2001]. Dans deux études randomisées contre placebo, la dose de 1,5 mg /j permet de réduire de façon significative le risque hémorragique. Dans une autre étude randomisée de phase II contre 30 mg 2/j d'énoxaparine, la dose de 1,5 mg/j semble aussi bien tolérée et efficace.

Le fondaparinux 1,5 mg /j a obtenu une autorisation européenne de mise sur le marché pour les patients insuffisants rénaux. Cependant la commission de transparence française n'a pas retenu cette approche scientifique (absence d'étude de phase III) pour valider le remboursement du médicament.

5.1.2 Objectif de l'étude

Afin que le fondaparinux 1,5 mg /j soit disponible en France pour la prise en charge des patients insuffisants rénaux modéré à sévère, nous proposons d'évaluer la pharmacocinétique du fondaparinux à la posologie de 1,5 mg/j, non plus dans la population de patients simulés, mais chez des patients réels ayant une insuffisance rénale définie par une clairance de la créatinine comprise entre 20 et 50 mL/min et ayant une indication de prévention de la MVTE après une chirurgie orthopédique majeure.

5.2 Patients et Méthodes

5.2.1 Plan de l'étude

L'étude PROPICE (Prophylaxie en chirurgie Orthopédique chez des patients Insuffisants rénaux définit par une clairance de la créatininE entre 20 et 50 mL/min) est une étude de cohorte, prospective, non comparative, multicentrique française, de patients traités

par une dose prophylactique de fondaparinux dans la prévention de la MVTE, après une chirurgie orthopédique majeure. Les patients ont été inclus par un réseau d'investigateurs appartenant au réseau du GETHCAM (Groupe d'Etude de la Thrombose et de l'Hémostase en Chirurgie de l'Appareil locoMoteur).

5.2.2 Patients et traitements

Tous les patients insuffisants rénaux définis par une clairance de la créatinine comprise entre 20 et 50 mL/min, opérés pour une chirurgie orthopédique majeure et relevant d'un traitement préventif de la maladie veineuse thromboembolique pendant au moins cinq jours ont été inclus. Les critères d'exclusion étaient ceux mentionnés dans le RCP du fondaparinux (mis à part ceux de la fonction rénale), les antécédents de thrombopénie induite par l'héparine, une numération plaquettaire sanguine inférieure à 100 G/L, les femmes enceintes ou en âge de procréer ou les personnes nécessitant un anticoagulant à dose efficace.

La première dose de 1,5 mg de fondaparinux devait être administrée au moins 6 heures après la fin de la chirurgie, la seconde dose au moins 12 heures après la première. La durée de traitement s'est faite selon les recommandations internationales [Geerts 2008].

Tous les patients ont donné leur consentement libre, éclairé, écrit et signé. L'étude a reçu l'autorisation du comité de protection des personnes sud ouest Rhône-Alpes et a été déclarée sur le registre www.clinicaltrial.gov sous le numéro (NCT00555438).

5.2.3 Collection des données et méthodes de dosage

Un à trois prélèvements ont été recueillis selon les recommandations établies à partir du modèle de population décrit dans l'étude POP-A-RIX, selon le principe de la D-optimalité implémenté dans le logiciel PFIM [Bazzoli 2010]. Les activités anti-Xa ont été mesurées dans chaque centre investigateur et dans un centre de référence. Pour la méthode de dosage centralisée, la gamme de mesure s'étendait de 0.07 à 1.5 mg/L de fondaparinux pour toutes les techniques de dosages. L'imprécision et l'erreur des méthodes de dosage étaient inférieure à 10% pour la plus faible des concentrations (0,07 mg/L).

Pour chaque patient des données démographiques ont été recueillies : âge, poids, taille, sexe. De la même façon que dans l'étude POP-A-RIX, des indicateurs ont été calculés : BSA, BMI, $ClCr_{C\&G}$, $ClCr_{MDRD}$.

5.2.4 Analyse des données

Les données ont été analysées par approche de population en utilisant les modèles non linéaires à effets mixtes implémentés dans le logiciel NONMEM version VI, level 2 [Boeckmann 1994].

La construction du modèle structurel et du modèle final s'est déroulée selon la même procédure que celle décrite dans l'étude POP-A-RIX (paragraphe 2.2.4.1 Construction du modèle). Seule la validation interne a été réalisée.

5.2.5 Intérêt des MNLEM dans l'étude PROPICE

L'étude PROPICE partage avec l'étude POP-A-RIX un certain nombre d'intérêt commun à l'utilisation des MNLEM. En effet, l'objectif de l'étude PROPICE est de déterminer la pharmacocinétique du fondaparinux dans une population particulière, les patients insuffisants rénaux, dans le cadre de la pratique clinique quotidienne. Il est donc essentiel de limiter le nombre de prélèvement par patient comme cela a été évoqué dans le paragraphe 2.2.1. De plus, l'identification de covariable permettra, dans cette étude, d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle de ce médicament, même dans une population très sélectionnée.

Par rapport à l'étude POP-A-RIX, il existait une contrainte supplémentaire dans l'étude PROPICE. La difficulté de recrutement des patients insuffisants rénaux étant importante, le nombre d'inclusions a été limité à 450 patients. Pour un nombre de prélèvements limité (2,5 dans l'étude POP-A-RIX), l'information collectée dans cette étude pouvait ne pas être suffisante pour décrire avec précision l'ensemble des paramètres du modèle. Nous avons donc réalisé une optimisation statistique des temps de prélèvement, ou D-optimalité, pour garantir le bon déroulement de l'étape de modélisation. Le principe de la D-optimalité consiste à optimiser un critère statistique basé sur le modèle pharmaco-statistique précédemment décrit dans l'étude POP-A-RIX. Le critère peut être soit maximisé quand il correspond au déterminant de la matrice de Fisher des paramètres du modèle, soit minimisé quand il correspond l'inverse de cette même matrice [Bazzoli 2010].

5.3 Résultats

5.3.1 Description de la population

Au total, 451 patients ont été inclus par 29 centres investigateurs français, de juin 2007 à juillet 2008. Neuf patients n'ont pas reçu de traitement par fondaparinux et n'ont pas été inclus dans l'analyse. Le nombre de patients retenu pour l'analyse était donc de 442 dont 193 ont bénéficié d'une chirurgie de PTH programmée (43,7%), 122 d'une chirurgie de PTG programmée (27,6%), et 127 (28,7%) ont été opérés pour fracture de hanche. Sur ces 442 patients, 4 sont décédés en cours d'hospitalisation et 6 entre J10 et un mois.

Les caractéristiques initiales des 442 patients sont fournies Tableau 6. Il s'agit d'une population âgée puisque plus de 86% des patients avaient un âge supérieur ou égal à 75 ans et plus de 31% avaient plus de 85 ans. Il s'agit également d'une population à nette prédominance féminine (80% des patients), avec une faible proportion de poids extrême ; plus de 88% des patients avaient un indice de masse corporelle (IMC) compris entre 18 et 30 kg/m². Cependant, près de 20% des patients ayant été opérés pour fracture de hanche ont un poids <50 kg. Enfin, il s'agit d'une population de patients fragiles pour la prise en charge anesthésique, près de 40% d'entre eux ayant un score pré-anesthésique élevé défini par un score ASA ≥ 3 (score de sévérité préopératoire de l'American Society of Anesthesiology).

Tableau 6. Caractéristiques démographiques par type de chirurgie des 442 patients analysés

		PTH (N=193)	PTG (N=122)	FH (N=127)	Total (N=442)
Age (années)	N	193	122	127	442
	Moyenne \pm ET	79,4 \pm 6,3	79,0 \pm 5,2	86,7 \pm 5,3	81,4 \pm 6,64
	Médiane	81,0	79,0	86,0	82,0
	Min - Max	58,0 – 92,0	60,0 – 93,0	65,0 – 99,0	58,0 – 99,0
	[55 - 65[3 (1,6%)	2 (1,6%)	0 (0,0%)	5 (1,1%)
	[65 - 75[38 (19,7%)	14 (11,5%)	2 (1,6%)	54 (12,2%)
	[75 - 80[41 (21,2%)	48 (39,3%)	4 (3,1%)	93 (21,0%)
	[80 - 85[71 (36,8%)	46 (37,7%)	35 (27,6%)	152 (34,4%)
	[85 - 90[36 (18,7%)	9 (7,4%)	51 (40,2%)	96 (21,7%)
	≥ 90	4 (2,1%)	3 (2,5%)	35 (27,6%)	42 (9,5%)

		PTH (N=193)	PTG (N=122)	FH (N=127)	Total (N=442)
Poids (kg)	Moyenne \pm ET	61,3 \pm 12,1	68,0 \pm 11,6	57,7 \pm 11,4	62,1 \pm 12,4
	Médiane	59,0	67,0	55,0	60,0
	Min – Max	39,0 – 124,0	45,0 – 114,0	40,0 – 94,0	39,0 – 124,0
	<50 kg	23 (11,9%)	2 (1,6%)	25 (19,7%)	50 (11,3%)
Sexe, n (%)	N	193	122	127	442
	Féminin	158 (81,9%)	87 (71,3%)	108 (85,0%)	353 (79,9%)
	Masculin	35 (18,1%)	35 (28,7%)	19 (15,0%)	89 (20,1%)
IMC (kg/m ²)	N	193	122	127	442
	≤ 18 kg/m ²	4 (2,1%)	0 (0,0%)	8 (6,3%)	12 (2,7%)
]18 - 30[175 (90,7%)	103 (84,4%)	113 (89,0%)	391 (88,5%)
	≥ 30 kg/m ²	14 (7,3%)	19 (15,6%)	6 (4,7%)	39 (8,8%)
Clairance de la créatinine Cockcroft et Gault	Moyenne \pm ET	39,9 \pm 7,4	42,0 \pm 6,7	34,5 \pm 8,1	39,0 \pm 8,0
	Médiane	41,5	43,4	34,2	40,2
	Min - Max	15,0 – 57,1	23,4 – 59,2	15,6 – 50,2	15,0 – 59,2
Clairance de la créatinine MDRD simplifiée	Moyenne \pm ET	54,2 \pm 14,0			
	Médiane	53,4			
	Min – Max	22,1 – 103,4			
Classe ASA ≥ 3 , n (%)	N	193	122	127	442
	Oui	57 (29,5%)	45 (36,9%)	72 (56,7%)	174 (39,4%)

5.3.2 Descriptions du traitement

Le fondaparinux devait être injecté à la posologie de 1,5 mg par jour et débuté à la 8^{ème} heure après la fermeture de l'incision chirurgicale. Plus de 4% des patients ont reçu leur 1^{ère} injection avant la 6^{ème} heure postopératoire et plus de 40% des patients ont reçu cette 1^{ère} injection avant la 8^{ème} heure, contrairement aux recommandations du protocole.

Le nombre moyen \pm ET de jours de traitement par fondaparinux a été de 20,2 \pm 9,5 jours (médiane : 21,0 jours). La durée totale de traitement par fondaparinux a été supérieure ou égale à 10 jours chez plus de 50 % des patients. En accord avec l'AMM, cette durée médiane de prescription était nettement plus prolongée en cas de fracture de hanche qu'en cas de chirurgie programmée.

5.3.3 Description des prélèvements et optimisations des temps de prélèvement

Au total 1184 mesures de l'activité anti-Xa provenant de 434 patients ont été mesurées de façon centralisées. Le nombre moyen de prélèvements par patient est de 2,7 (figure 20). La limite de quantification des activités anti-Xa a été fixée à 0.05 mg/L ce qui concerne 113 prélèvements (9,5%).

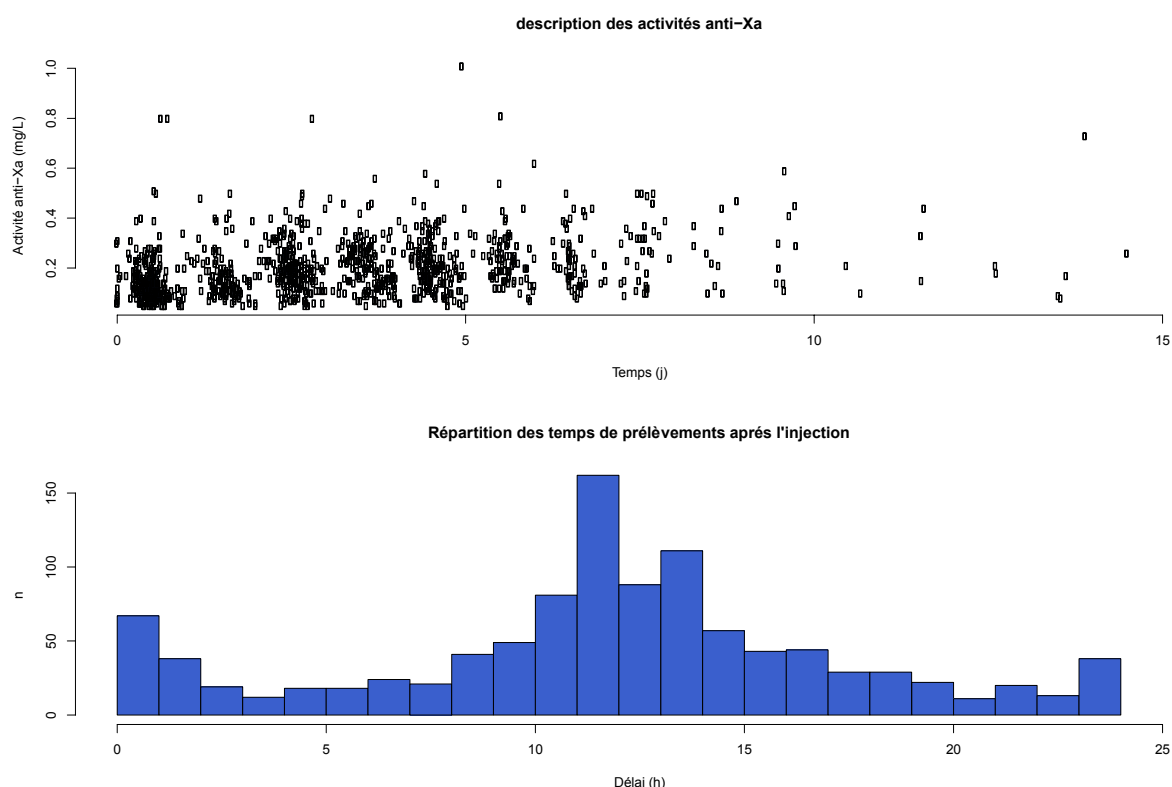


Figure 20. Description des prélèvements

5.3.4 Modélisation pharmacocinétique

Le modèle structurel de l'étude POP-A-RIX a servi de base à la construction du modèle de l'étude PROPICE. Il s'agit d'un modèle à 2-compartiments avec une absorption d'ordre 1. Les paramètres du modèle étaient : la clairance apparente (Cl/F), le volume apparent du compartiment central ($V2/F$), le volume apparent du compartiment périphérique ($V3/F$), la clairance apparente inter-compartimentale (Q/F) et la constante d'absorption (Ka). Une variabilité inter-individuelle a été estimée pour tous les paramètres de population. Un bloc de covariance a été estimé entre le Cl/F et $V2/F$.

A partir de ce modèle structurel, différentes covariables cliniquement pertinentes ont été testées. Ces covariables comprenaient l'âge, le poids, le sexe, la surface corporelle, l'indice de masse corporelle et les différents estimateurs de la fonction rénale ($ClCr_{C\&G}$ et $ClCr_{MDRD}$). Le choix des covariables s'est fait selon les critères d'ajustement graphique, la fonction objective et la précision des paramètres. Au final, seule la clairance à la créatinine estimée par la formule de Cockcroft et Gault sur la clairance du fondaparinux a permis de diminuer significativement la fonction objective du modèle de -2704 à -2750. La variabilité inter-individuelle de la Cl/F a diminué de 45,2% à 40,1%. Les paramètres finaux du modèle sont regroupés dans le tableau 7.

Tableau 7. Paramètres pharmacocinétiques du fondaparinux

Paramètres	Valeur [95% IC]	VII CV% [95% IC]
K_a (h^{-1})	1,24 [0,83 – 1,65]	83,4 [31,1 – 113]
Cl ($L \cdot h^{-1}$) = $\theta_1 \times (CrCl/40)^{\theta_2}$		40,1 [35,2 – 44,5]
θ_1	0,221 [0,204 – 0,237]	
θ_2	0,843 [0,593 – 1,093]	
V_2 (L)	6,15 [5,56 – 6,74]	40,2 [27,6 – 49,8]
Q ($L \cdot h^{-1}$)	0,121 [0,064 – 0,178]	136 [113 – 156]
V_3 (L)	13,6 [10,5 – 16,7]	0 FIX
σ^2 proportionnelle (CV%)	23,8 [17 – 22]	
<i>[95% IC]: Intervalle de confiance à 95% ; σ^2: variance résiduelle, VII: Variabilité inter-individuelle</i>		

L'équation suivante décrit la façon dont la covariable a été intégrée dans le modèle final.

$$Cl / F = 0,221 \times \left(\frac{CrCl}{40} \right)^{0,843}$$

A partir de cette équation, on estime que la clairance du fondaparinux est diminuée de 35% quand la clairance de la créatinine diminue de 50 à 30 mL/min et de 64% quand la clairance de la créatinine diminue de 50 à 15 mL/min.

La figure 21 montre les principales représentations graphiques d'ajustement du modèle aux observations. L'exposition moyenne pour la population de patients inclus dans l'étude est représentée Figure 22.

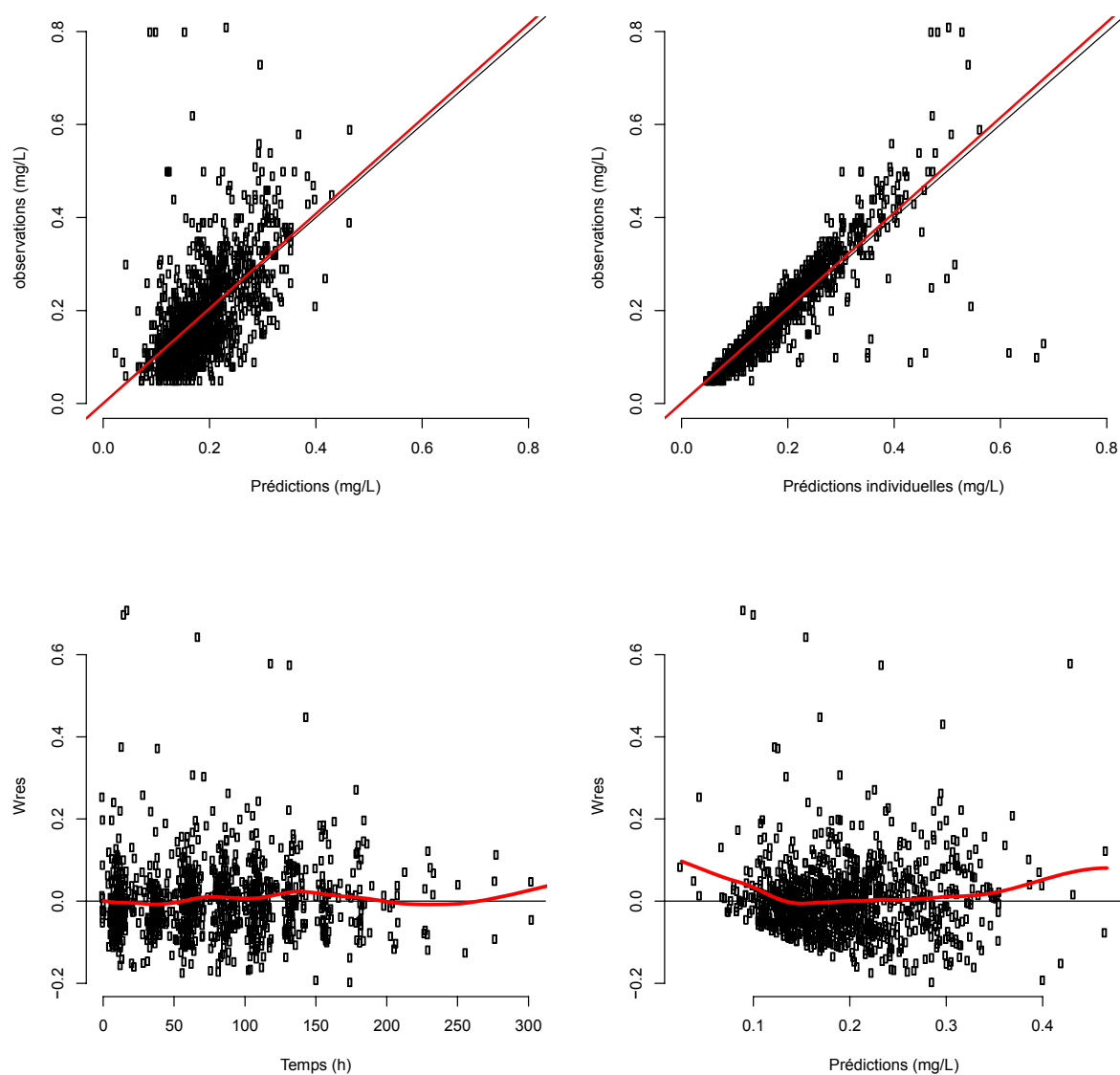


Figure 21. Graphiques d'ajustement du modèle aux activités anti-Xa du fondaparinux

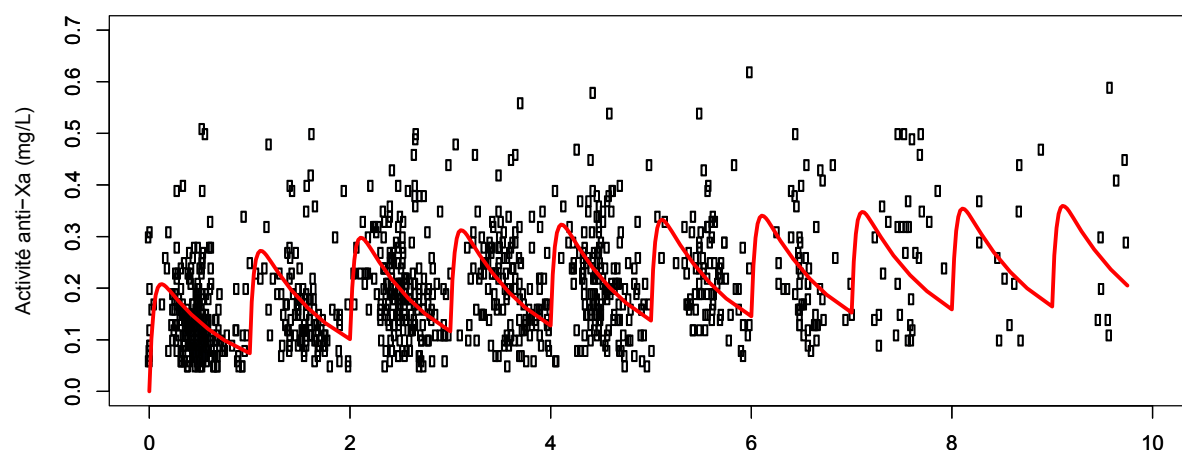


Figure 22. Exposition moyenne du fondaparinux des patients inclus dans PROPICE

Les points bleus représentent les activités anti-Xa en fonction du temps de recueils ; les profils rouges représentent l'exposition pour un patient moyen avec une administration de 1,5 mg de fondaparinux toutes les 24 heures.

5.3.5 Validation du modèle PK

Afin de valider le modèle final, les paramètres pharmacocinétiques ont été simulés 1000 fois pour la base de données. La figure 23 permet de visualiser le résultat du Visual Predictive Check et la superposition des données observées. La majeure partie des données observées est contenue dans l'intervalle de prédiction de 90%.

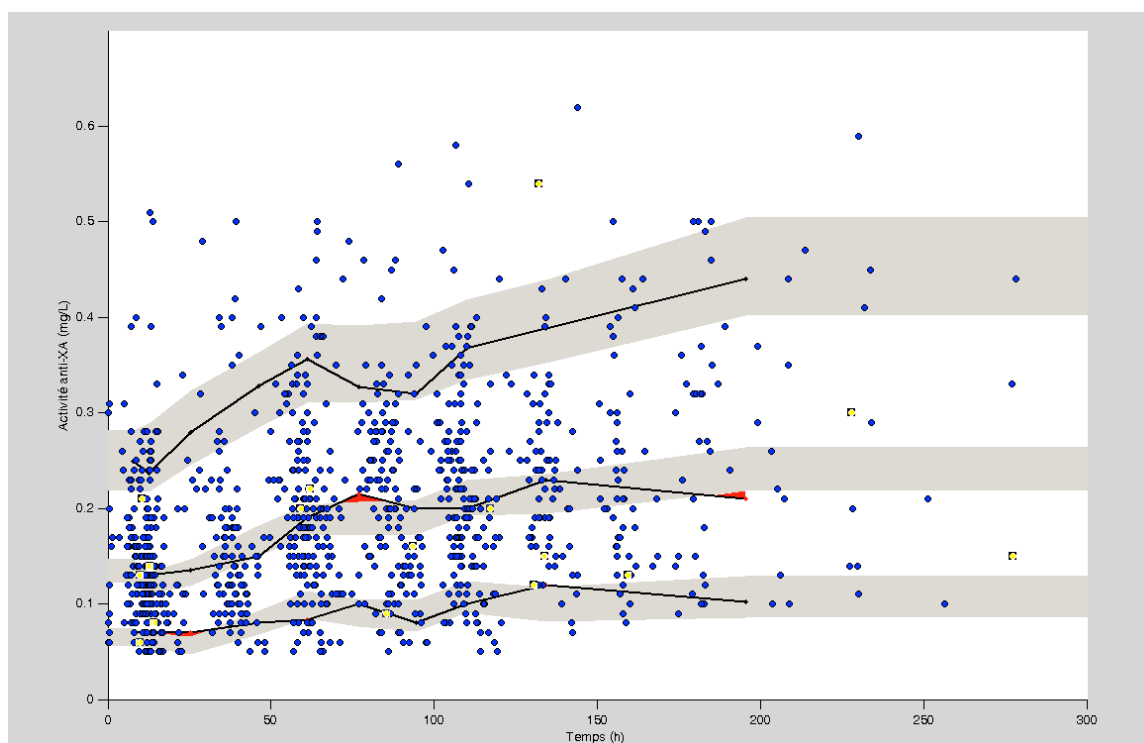


Figure 23. Visual Predictive Check du modèle

Les lignes noires représentent le 5, 50, et 95 quantile des observations. Les surfaces grises représentent l'intervalle de confiance des simulations pour les quantiles correspondants.

5.3.6 Apports des modèles MNLEM dans l'étude PROPICE

5.3.6.1 Estimations individuelles et comparaison des données

A partir des estimations du modèle de population, différentes estimations individuelles ont été réalisées par estimations bayésiennes. Pour chaque patient, l'aire sous la courbe (AUC), la concentration maximum (C_{max}) et la concentration résiduelle (C_{min}) ont été estimées.

5.3.6.2 Simulations

Le modèle décrit dans cette étude a été la base de simulations pour différentes valeurs de clairance de la créatinine. Sur la figure 24, on retrouve l'effet de la clairance rénale sur l'accumulation du fondaparinux. Après 10 jours de traitement ces simulations montrent que l' AUC_{j10} est augmentée de 74%, la C_{maxj10} de 53% et la C_{minj10} de 112% chez les patients avec une clairance de la créatinine de 20 mL/min par rapport aux patients avec une clairance de la créatinine de 50 mL/min.

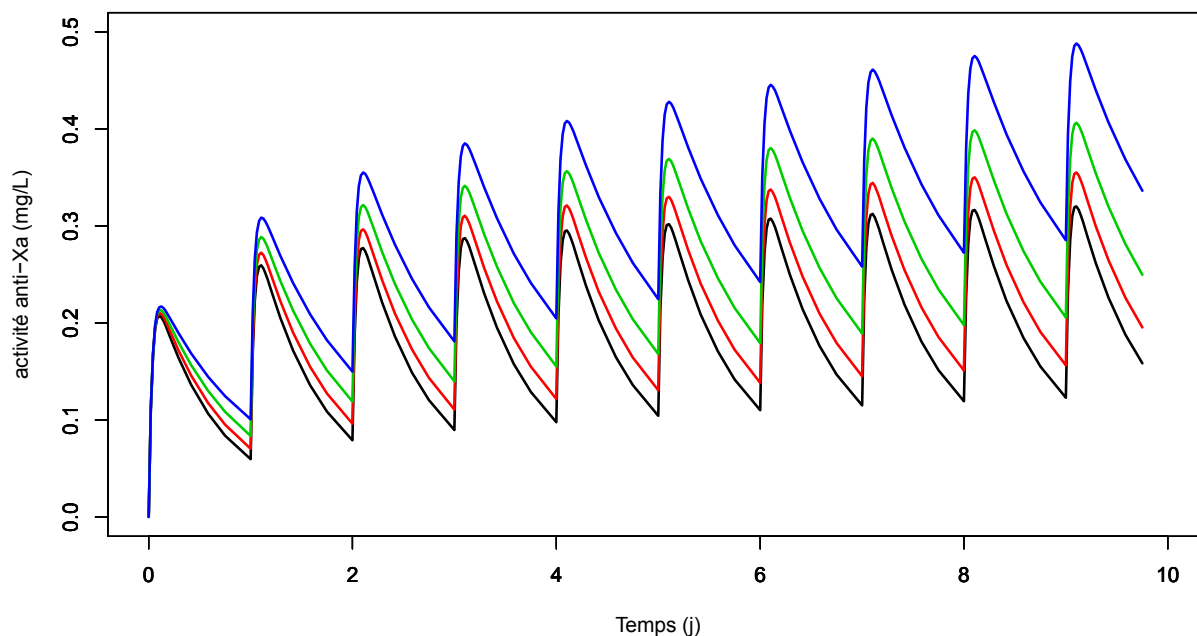


Figure 24. Simulations d'exposition du fondaparinux pour différentes clairances de la créatinine

La courbe rouge représente une exposition pour un patient avec une clairance de la créatinine de 50 mL/min ; la courbe rouge 40 mL/min ; vert 30 mL/min ; bleu 20 mL/min

5.3.6.3 Comparaisons des performances des différents modèles du fondaparinux

A ce jour, 3 modèles de population de la pharmacocinétique du fondaparinux ont été décrits. Ils correspondent à trois populations différentes: une population sélectionnée de patients inclus dans les études de phase II/III, une population non sélectionnée correspondant à la pratique clinique quotidienne et une population de patients insuffisants rénaux. Nous avons comparé les performances graphiques (figure 25) et statistiques (Tableau 8) de chaque modèle sur les patients inclus dans l'étude PROPICE. Le modèle de l'étude POP-A-RIX possède des critères graphiques, un biais et une précision aussi performant que le modèle de l'étude PROPICE. Sur ces mêmes critères, le modèle des études de phase II/III est moins performant pour prédire les activités anti-Xa du fondaparinux pour les patients insuffisants rénaux. La moyenne des erreurs est deux fois plus importante que pour le modèle de POP-A-RIX ou de l'étude PROPICE.

Tableau 8. Comparaison des biais et précisions des 3 modèles de populations décrits pour le fondaparinux et testés sur les patients de l'étude PROPICE

Paramètre	Etude PROPICE	Etude POP-A-RIX	Etude phase II/III
Biais (ME)	-0.006	0.005	-0.014
Précision (MSE)	0.008	0.008	0.008

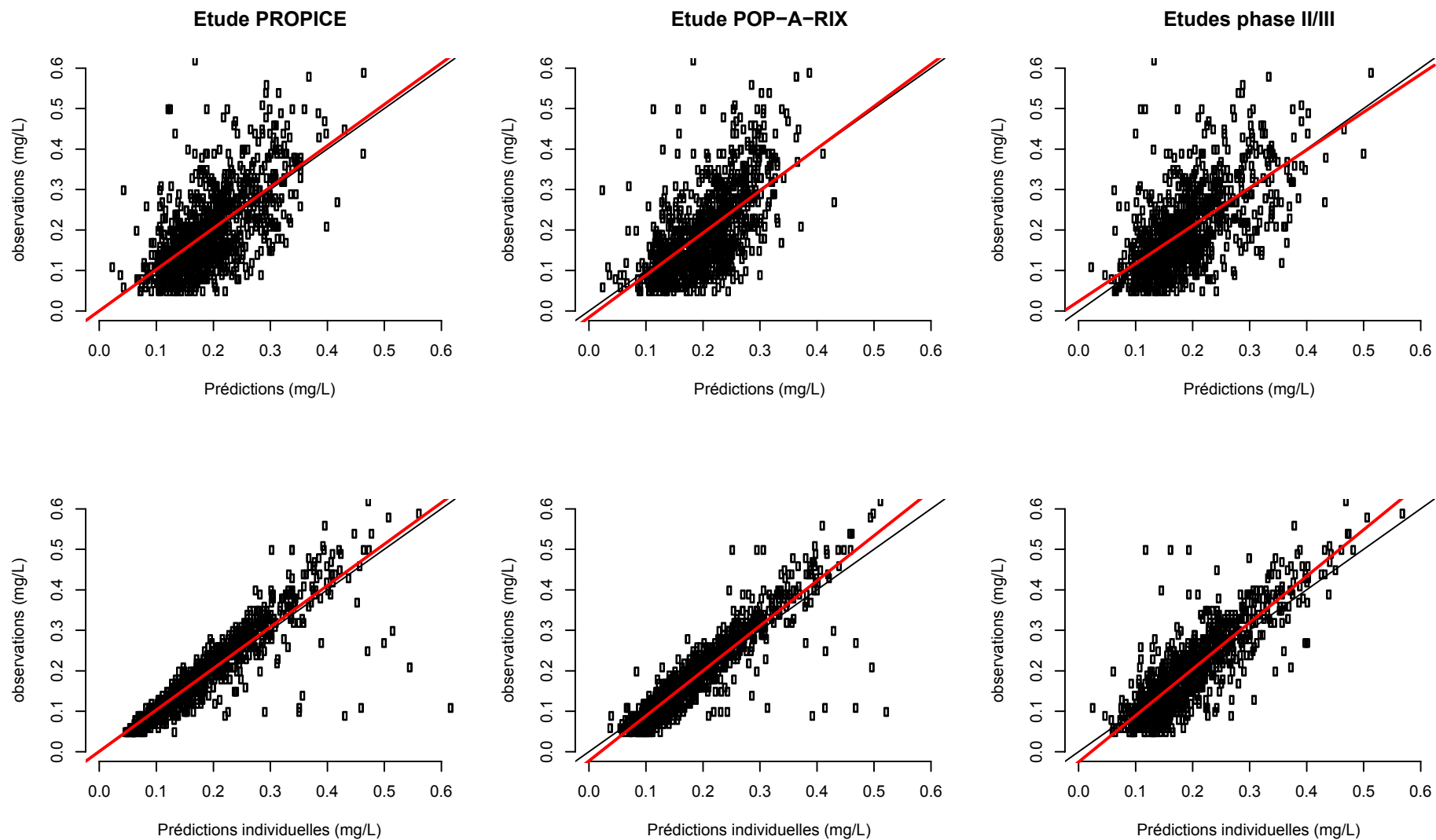


Figure 25. Comparaisons graphiques des performances des 3 modèles de population du fondaparinux sur les patients inclus dans l'étude PROPICE

5.3.6.4 Comparaisons des expositions

Les expositions des patients insuffisants rénaux à 1,5 mg de fondaparinux par jour ont été comparées avec les expositions des patients avec une fonction rénale normale à 2,5 mg de fondaparinux par jour. Pour cela des comparaisons ont été réalisées à partir de simulations effectuées à partir des modèles de populations de l'étude PROPICE et POP-A-RIX.

Pour comparer les expositions du fondaparinux 1,5 mg/j et 2,5 mg/j, deux populations de 500 patients ont été simulées. La première population avait les mêmes caractéristiques démographiques de l'étude POP-A-RIX (exclusion des patients insuffisants rénaux), l'autre population avait les mêmes caractéristiques démographiques que les patients inclus dans l'étude PROPICE. Des comparaisons statistiques ont été réalisées entre ces deux populations pour les principaux paramètres pharmacocinétiques d'intérêts, estimés le septième jour de traitement par fondaparinux 1,5 ou 2,5 mg /j, nécessaires à l'obtention de l'état d'équilibre pharmacocinétique.

L'objectif initial de cette étude était d'évaluer et comparer l'exposition à 1,5 mg/j de fondaparinux chez des patients insuffisants rénaux par rapport à la dose de 2,5 mg/j chez les patients avec une fonction rénale normale. Cette réduction de posologie a été proposée à partir de simulations basées sur le modèle développé à partir des résultats d'études de phase II/III. Seuls les paramètres du modèle développé à partir des études de phase II/III sont connus mais sans la description précise des caractéristiques démographiques des patients inclus dans cette analyse. Nous avons cependant comparé l'exposition des patients de l'étude PROPICE avec ceux de la pratique clinique réelle inclus dans l'étude POP-A-RIX. A partir des caractéristiques de chaque population, nous avons simulé les caractéristiques de deux populations de 5000 patients dont les distributions des caractéristiques démographiques (âge, poids, fonction rénale) étaient identiques à celles de chacune de ces deux études. La figure 26 représente les intervalles à 90% des profils de concentration simulés pour chacune des populations. Elle montre que les expositions ne sont pas équivalentes. La dose de 1,5 mg /j chez les patients insuffisants rénaux expose moins les patients que la dose de 2,5 mg /j chez les patients avec une fonction rénale normale.

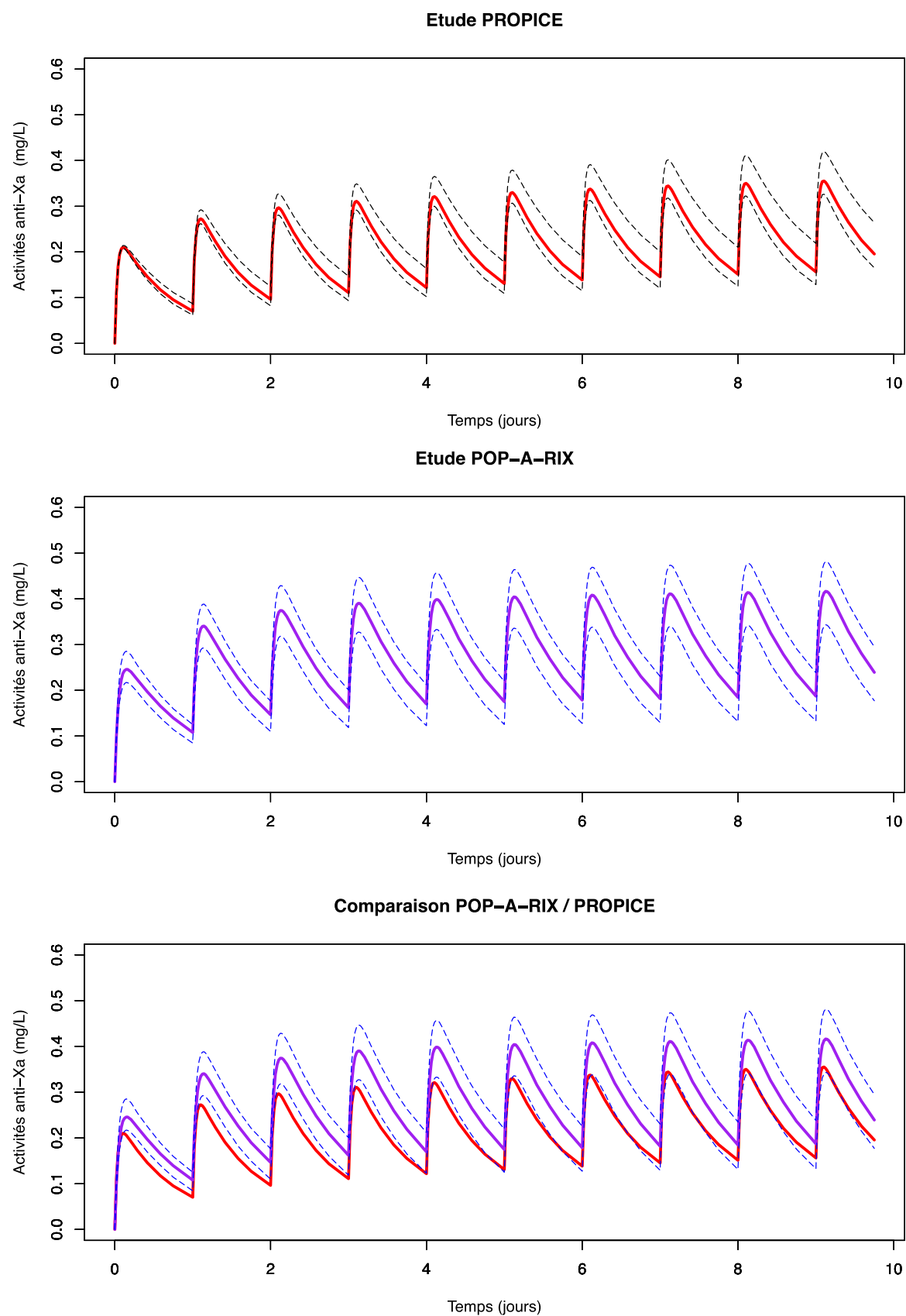


Figure 26. Simulation et comparaison des expositions pour les patients de l'étude POP-A-RIX (2,5 mg/j) et les patients de l'étude PROPICE (1,5mg/j)

5.4 Discussion sur l'étude PROPICE

L'étude PROPICE est l'une des rares études de cohorte prospective de patients insuffisants rénaux traités par de fondaparinux. Il s'agit de la première étude permettant d'évaluer la pharmacocinétique du fondaparinux dans cette population extrême. Cette population de patients insuffisants rénaux représente pourtant un véritable enjeu dans la pratique clinique quotidienne. En effet la partie de la population insuffisante rénale nécessitant une chirurgie orthopédique majeure représente 7 à 15% en fonction du type de chirurgie, d'après les études observationnelles [Rosencher 2005; Samama 2007]. De plus, très peu d'informations et de thérapeutiques sont disponibles dans la prévention de la MVTE pour cette population.

A partir de la cohorte de 436 patients inclus et des 1100 dosages d'activités anti-Xa de cette étude nous avons décrit l'exposition du fondaparinux et établi le modèle pharmacocinétique du fondaparinux dans cette population de patients à risque d'accumulation. Nous avons montré que le meilleur modèle pharmacocinétique pour décrire les activités anti-Xa du fondaparinux était un modèle à 2 compartiments avec une absorption d'ordre-1. Parmi les covariables, seule la fonction rénale estimée par la clairance de la créatinine a permis d'expliquer une partie de la variabilité de la clairance d'élimination du fondaparinux. Cette relation est bien sûr en accord avec les propriétés pharmacologiques du fondaparinux puisque ce médicament est éliminé principalement sous forme active par voie rénale. La meilleure formule pour estimer la clairance de la créatinine et sa relation avec la clairance d'élimination est celle de Cockcroft & Gault. Dans l'étude POP-A-RIX, trois covariables ont permis d'expliquer la variabilité de la clairance d'élimination du fondaparinux: l'âge, le poids et la clairance de la créatinine. La formule pour estimer la clairance de la créatinine était celle du MDRD simplifié. Ces résultats ne sont cependant pas discordants. La relation avec l'âge de ces deux formules d'estimation de la clairance de la créatinine est différente. De plus l'âge n'est pas compris dans la formule du MDRD simplifié. Au final, on retrouve les mêmes covariables dans les deux modèles (âge, créatinine sérique et poids) mais implémentés directement par l'intermédiaire de la formule de la clairance de la créatinine. Le modèle de l'étude, bien que plus complexe, permet de mieux rendre compte de l'influence de la fonction rénale dans une population non sélectionnée. Ce qui est confirmé lorsque le modèle de l'étude POP-A-RIX est utilisé pour prédire les activités anti-Xa des patients insuffisants rénaux avec des performances équivalentes entre les modèles. Le modèle

de l'étude PROPICE garde néanmoins un intérêt dans les prédictions individuelles bayésiennes.

La comparaison des expositions du fondaparinux pour des patients non insuffisants rénaux avec une posologie de 2,5 mg /j avec des patients insuffisants rénaux avec une posologie de 1,5 mg/J n'est pas équivalente. Les patients insuffisants rénaux sont moins exposés que les patients avec une fonction rénale normale. Il faut rappeler que la réduction de dose proposée chez les patients insuffisants rénaux a été établie à partir de simulations basées sur le modèle développé à partir des patients inclus dans les phases II/III du développement du médicament [Eriksson 2001; Turpie 2001; Turpie, Bauer, 2002; Turpie 2009]. Dans l'étude POP-A-RIX nous avons mis en évidence les limites de ce modèle pour prédire les expositions du fondaparinux dans des populations extrêmes (petits poids, personnes âgées ou insuffisantes rénales), patients peu représentés dans les études de phase II/III.

Pourtant l'exposition n'est pas équivalente entre le fondaparinux 1,5 mg chez les patients insuffisants rénaux et chez les patients avec une fonction rénale normale et une administration de fondaparinux 2,5 mg.

PARTIE III : l'utilisation des MNLEM pour résumer un modèle de réponse complexe de relation pharmacocinétique - pharmacodynamique avec la fluindione et l'acénocoumarol, et la prise en compte de covariables notamment des facteurs génétiques.

6 Modélisation PK/PD pour prédire l'impact du polymorphisme génétique de CYP2C9 et VKORC1 sur la fluindione et l'acénocoumarol.

6.1 Introduction

6.1.1 Contexte de l'étude

Les médicaments AVK sont très largement utilisés dans le traitement de la thrombose veineuse, des accidents vasculaires cérébraux et des infarctus du myocarde, pathologies associées à de fréquentes complications [White 1999; Higashi 2002]. On estime que près de 1% de la population française est traité par AVK [Affsaps 1998]. Pourtant ces médicaments possèdent la plus importante iatrogénie à cause du risque hémorragique qui leur est associé. Les AVK représentent en France 37% des événements indésirables graves soit environ 17000 hospitalisations par an [Affsaps 1998, 2008]. La raison principale provient de leurs marges thérapeutiques étroites associée à une très grande variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique. Par exemple, pour obtenir des effets thérapeutiques optimaux on utilise des doses allant de 0,5 à 60 mg chez des patients traités par la warfarine [Takahashi 2001], et des doses allant de 1 à 56 mg d'acénocoumarol [Visser 2004]. Pour ces raisons, l'adaptation des doses d'AVK doit se faire selon un marqueur d'effet comme l'International Normalized Ratio (INR) ou le temps de prothrombine, nécessaire pour évaluer le niveau d'anticoagulation. Parmi les différentes sources de variabilité identifiées, on retrouve l'âge, le poids, le tabagisme, l'environnement, les interactions médicamenteuses [Richards 1943; O'Reilly 1980; Arnsten 1997]. Plus récemment, le polymorphisme de certains gènes a montré son implication dans la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique de ces molécules (Cf paragraphe 2.2).

Bien que l'effet des différents polymorphismes soit bien évalué pour la warfarine et l'acénocoumarol, peu d'éléments sont disponibles sur la fluindione. Cependant, nous pouvons

supposer que ces mêmes polymorphismes puissent influencer de la même façon la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de la fluindione.

En 2007, la Food and Drug Administration a mis à jour les RCP des coumariniques et recommande de déterminer le génotype des patients. Plusieurs algorithmes sont aujourd'hui disponibles pour optimiser ces traitements. Mais la question reste entière sur la susceptibilité de la fluindione, en particulier dans les premiers mois de l'initiation du traitement.

6.1.2 Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est de développer un modèle de population pour la fluindione et l'acénocoumarol afin de décrire les relations doses/concentrations/effets et ainsi essayer d'expliquer la variabilité de ces médicaments par des facteurs génétiques, démographiques ou environnementaux. Dans un deuxième temps, nous évaluerons comment les covariables peuvent modifier l'initiation de ces traitements.

6.2 Patients et méthodes

6.2.1 Plan de l'étude

Il s'agit d'une étude ouverte, randomisée avec un plan croisé. Une détermination du phénotype du CYP1A2 a été réalisée deux semaines avant la première prise de médicament.

- Période I : Chaque sujet recevait soit 20 mg de fluindione (Previscan®, 20 mg, Procter Gamble Pharmaceuticals, France) soit 4 mg d'acénocoumarol (Sintron® 4 mg, Novartis Pharma, France) le matin à 9h. Le matin du 2e jour, les sujets étaient hospitalisés et recevaient une deuxième dose du même anticoagulant (20 mg de fluindione ou 4 mg d'acénocoumarol). Les traitements étaient absorbés avec 150 mL d'eau. Pendant cette première période, 11 prélèvements sanguins ont été réalisés à t=0 ; 24 ; 24,5 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 32 ; 36 ; 48 ; 72 heures.
- Période de « wash-out » de deux semaines
- Période II : Elle se déroulait de façon identique à la période I, mais les patients qui avaient reçu la fluindione recevaient l'acénocoumarol et inversement.

6.2.2 Description des sujets volontaires

À partir d'une base de données pharmacogénétique, 24 volontaires sains ont été inclus selon leur caractéristique génotypique concernant le gène CYP2C9 afin d'obtenir une bonne répartition entre les allèles sauvages et mutées. Parmi les critères d'inclusion, on retrouvait un examen clinique normal, l'absence d'antécédent, un ECG, des tests biologiques et hématologiques normaux. Une semaine avant l'inclusion, toute prise médicamenteuse ou consommation de jus de fruit était interdite. Vingt-quatre heures avant l'administration des traitements, la consommation de boisson à base de caféine, de thé, de café ou de chocolat était proscrite pour ne pas interférer avec le test phénotypique du CYP1A2. L'étude s'est déroulée au Centre d'Investigation Clinique de l'hôpital Universitaire Saint-Antoine (Assistance Publique Hôpitaux de Paris). Tous les sujets ont donné leur consentement libre et éclairé avant leur inclusion. Le protocole de cette étude a été approuvé par le Comité de Protection des Personnes.

6.2.3 Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins veineux ont été recueillis sur des tubes citratés (Vacutainer®, Becton Dickinson, Angleterre) pour la mesure de l'INR et sur tube héparinés pour la mesure des concentrations de fluindione et de R- et S-acénocoumarol. Les concentrations d'anticoagulants ont été déterminées pour les temps 24 ; 24,5 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 32 ; 36 ; 48 heures. Les INR ont été mesurés pour les temps 0 ; 24 ; 24,5 ; 32 ; 36 ; 48 ; 72 heures.

6.2.4 Génotypage

Les polymorphismes génétiques CYP2C9*2 (rs 1799853), CYP2C9*3 (rs 1057910) et VKORC1 C>T (rs 9934438) ont été déterminés avec des kits modifiés selon les méthodes précédemment décrites de Taq Man allelic discrimination assays® (Applied Biosystems, USA) [Verstuyft, Morin, 2003; Morin 2004; Bodin 2005; Larramendy-Gozalo 2006]. Les amorces et fluorochromes ont été dessinés avec le logiciel Primer Express® (Applied Biosystem, USA). La mesure de la fluorescence des amplicons de PCR synthétisés a été réalisée par le logiciel Sequence detector System software (version 1.2.3, Applied Biosystem, France).

6.2.5 Méthodes analytiques

Les concentrations de fluindione ont été déterminées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) par une méthode précédemment décrite [Aymard 1998]. Les concentrations de R- et S-acénocoumarol ont été déterminées par une chromatographie enantiomérosélective après une dérivation par N-carbobenzoyl-L-proline [Gill 1988].

L'activité phénotypique du CYP1A2 a été estimée en calculant le ratio métabolique de la paraxantine sur la caféine, 5 heures après l'administration de 140 mg de caféine (Nescafé, neslé). La caféine et ses métabolites ont été quantifiés par HPLC [Simon 2001].

L'INR a été déterminé par un automate Thromborel® (Dade Behring, Allemagne).

6.2.6 Intérêt de l'utilisation d'un MNLEM dans cette étude

Une partie de l'objectif de cette étude était d'étudier l'influence de variants alléliques codant pour différentes enzymes ou cibles impliquées dans le métabolisme ou l'effet des médicaments AVK. Pour évaluer l'ensemble des variations pharmacocinétique et pharmacodynamique liés à ces variants alléliques dans une seule cohorte, il faudrait disposer de sous-groupe équivalents pour chaque variant allélique de chaque gène. Dans la pratique, cela est impossible, car la fréquence de certains allèles est très faible. En multipliant le nombre de gènes à étudier, l'équilibre de chaque sous-groupe devient alors impossible. Les MNLEM sont une excellente alternative à l'analyse classique, car ils permettent une analyse multivariée de l'influence des covariables sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du médicament à condition que les sous groupes comportent au moins quelques individus.

6.2.7 Modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique

La stratégie de modélisation utilisée dans cette étude était plus complexe que celle utilisée dans les précédentes études. Il s'agissait ici d'intégrer des données de différentes natures (pharmacocinétique et pharmacodynamique) et de modéliser leur relation. Le modèle final a été construit en plusieurs étapes.

Le logiciel non linéaire à effet mixte MONOLIX (version 3.1) a été utilisé pour la meilleure convergence de son algorithme dans les modèles PK/PD complexes [Kuhn and Lavielle 2005]. La méthode d'estimation des paramètres est basée sur l'estimation de la vraisemblance

du modèle sans approximation (linéarisation, quadratique, etc.) et utilise un algorithme d'approximation stochastique par maximisation de la vraisemblance (Stochastic Approximation Expectation Maximization ; SAEM). De plus, ce logiciel permet aussi de déterminer la moyenne conditionnelle et le mode des paramètres individuels par des méthodes de Monte-Carlo par chaînes de Markov.

6.2.7.1 Construction du modèle structurel pharmacocinétique

Dans un premier temps, seules les données pharmacocinétique ont été analysées puis différentes structures compartimentales, type d'absorption ont été évaluées. Les variabilités interindividuelles des paramètres de population ont été considérées log-normale. Différents modèles d'erreur (variabilité intra-individuelle) ont été testés : erreur additive, proportionnelle ou mixte. La sélection des modèles s'est faite sur la visualisation des graphiques d'ajustement du modèle et de différents tests de rapport de fonction objective, du critère d'Akaike ou du critère d'information bayésien.

6.2.7.2 Construction du modèle structurel pharmacocinétique et pharmacodynamique

La modélisation mathématique de la relation PK/PD a pour objectif de prédire l'INR en fonction des concentrations et de la dose d'AVK.

L'acénocoumarol est un mélange racémique de composés : le R- et S-acénocoumarol. Nous avons évalué si un seul des énantiomères ou une combinaison des deux était à l'origine de la modification de l'INR. Pour cela, un modèle complexe d'interaction pharmacodynamique basé sur le travail de Minto a été utilisé [Minto 2000].

Pour simplifier l'expression mathématique, nous supposons dans l'exemple ci-dessous que l'effet des énantiomères R- et S-, lorsqu'ils sont seuls, sont décrits par un modèle du Emax (modèle hyperbolique).

$$E = E_{\max} \times \frac{(C_R/C_{R50})^{S_R}}{1 + (C_R/C_{R50})^{S_R}} ; E = E_{\max} \times \frac{(C_S/C_{S50})^{S_S}}{1 + (C_S/C_{S50})^{S_S}}$$

E_{max} représente l'effet maximum observé ; C_{R,S} représente la concentration de S- ou R-acénocoumarol ; C_{R,S50} représente la concentration de S- ou R-acénocoumarol entraînant 50% de l'effet maximum ; S_{R,S} représente le coefficient de sigmoïdité de S- ou R-acénocoumarol.

On définit des concentrations normalisées pour chacun des énantiomères :

$$U_R = \frac{C_R}{C_{R50}} \text{ et } U_S = \frac{C_S}{C_{S50}}$$

et la proportion normalisée de S par rapport à la concentration normalisée totale :

$$\theta = \frac{U_S}{U_S + U_R} ; \theta \in [0,1]$$

On définit alors le modèle d'interaction globale de la façon suivante :

$$E = E_{\max} \times \frac{\left(\frac{U_R + U_S}{U_{50}(\theta)} \right)^{q(\theta)}}{1 + \left(\frac{U_R + U_S}{U_{50}(\theta)} \right)^{q(\theta)}}$$

Dans cette équation $U_{50}(\theta)$ est sans dimension et vaut 1 s'il n'y a pas d'interaction entre

les énantiomères R- et S-acénocoumarol.

Le modèle du E_{\max} n'est pas un bon modèle pour établir la relation entre la concentration et l'effet des médicaments AVK. En effet, il existe un délai entre l'observation de la concentration maximum du médicament et son effet maximum.

Quand on trace la courbe des INR (effets) en fonction des concentrations, en tenant compte du temps, on observe une boucle appelée hystérèse (figure 27). Le phénomène d'hystérésis est particulier puisque, pour une même concentration, on observe deux effets différents et réciproquement.

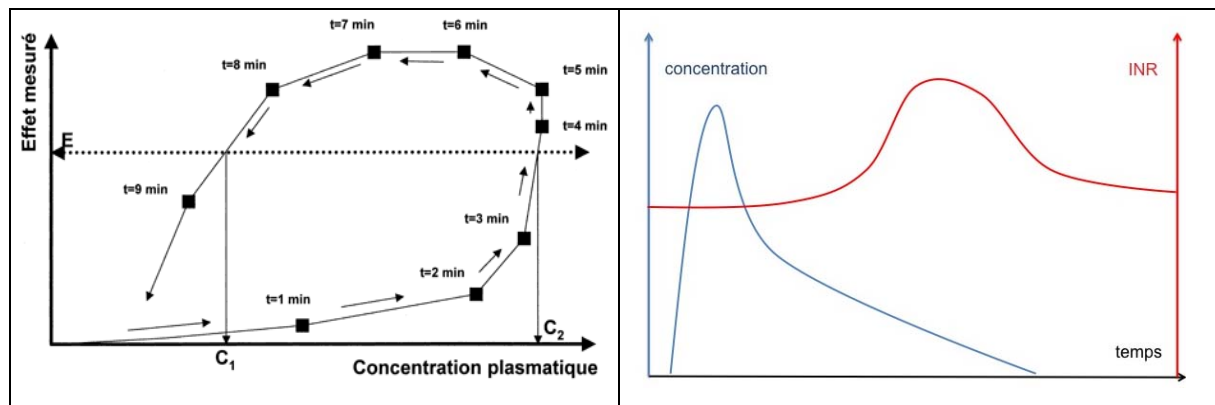


Figure 27 : Représentation du phénomène d'hystérésis

Ce phénomène est expliqué par le fait que les concentrations maximales sont atteintes avant l'effet maximal. Ainsi, du fait de ce décalage, l'utilisation d'un modèle classique linéaire ou de Hill (modèle du Emax) ne tenant pas compte du temps, n'est pas appropriée.

Pour modéliser ce type de relation PK/PD, on fait appel à un modèle particulier comme le modèle de réponse indirecte, pour lequel 4 profils pharmacodynamiques ont été décrits [Dayneka 1993] (figure 28). Le modèle de réponse indirecte relie les concentrations aux effets du médicament selon les mécanismes tels que l'inhibition ou la stimulation de la production (synthèse) ou de la disparition (dégradation) des facteurs qui contrôlent l'effet du médicament. Le modèle N°1 de la figure 28 correspond à l'inhibition de la synthèse décrit par Dayneka [Dayneka 1993] et a été appliqué par Jusko et al. pour modéliser l'inhibition du complexe prothrombinique par la warfarine [Jusko 1994] et par Mentré et al. avec la fluindione [Mentré 1998].

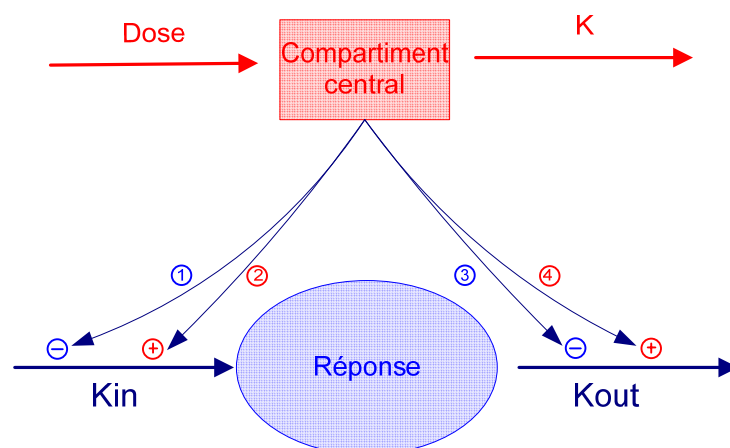


Figure 28. Représentation du modèle de réponse indirecte

1 représente l'inhibition de la synthèse de l'effet ; 2 représente l'augmentation de la synthèse de l'effet ; 3 représente l'inhibition de la dégradation de l'effet ; 4 représente la dégradation de l'effet.

L'expression mathématique générale des quatre modèles de réponse indirecte s'écrit :

$$\frac{dR}{dt} = K_{syn} \times [1 \pm H_1(C_p)] - K_{deg} \times [1 \pm H_2(C_p)] \times R$$

- R représente l'effet du médicament
- K_{syn} représente la vitesse de synthèse du médiateur
- K_{deg} représente la constante de vitesse de dégradation du médiateur
- $H_n(C_p)$ est la fonction définie par un modèle du E_{max} (effet maximum)
- C_p est la concentration plasmatique du médicament

l'INR augmente alors que la synthèse des facteurs de la coagulation diminue. On rappelle que les AVK inhibent la production de facteur de la coagulation de façon indirecte (VKORC). Pour garder la cohérence du mécanisme d'action avec ce type de modèle (inhibition de la réponse), nous avons réalisé une transformation de l'INR par son inverse comme cela a déjà été proposé par Mentré [Mentré 1998]. Le modèle PK/PD finalement retenu est décrit par l'équation suivante :

$$\frac{d(1/INR)}{dt} = k_{syn} \times \left(1 - \left(\frac{C_t^s}{C_t^s + C_{50}^s} \right) \right) - k_{deg} \times 1/INR$$

Dans ce modèle, quatre paramètres sont à estimer : k_{syn} la constante apparente d'ordre-0 correspondant à la synthèse de la réponse (INR = facteur de la coagulation) ; k_{deg} la constante d'ordre-1 de dégradation de la réponse ; S représente le coefficient de sigmoïdité ; C_t représentent la concentration de fluindione ou d'acénocoumarol ; C_{50} est la concentration de fluindione ou d'acénocoumarol qui inhibe 50% de 1/INR. La variabilité interindividuelle des paramètres de population est considérée comme log-normale. Différents modèles d'erreur pharmacodynamique ont été évalués (additif, proportionnel, mixte).

6.2.7.3 Construction du modèle final

Une fois le modèle structurel PK/PD défini, nous avons évalué l'existence potentielle de covariables permettant d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle. Les covariables ont été introduites par ordre d'importance et de liaison avec un paramètre à partir des représentations graphiques. Les covariables ont été introduites dans le modèle selon deux processus :

- Pour les variables continues : Ex : $V2 = \theta_2 * (\text{poids} / \text{médiane des poids})^{\theta_3} * \eta_2$
- Pour les variables discrètes : Ex : $Cl = \theta_1 \times \exp \eta_1$ pour le génotype CYP2C9*1

$$Cl = \theta_1 \times \theta_2 \times \exp \eta_1 \text{ pour le génotype CYP2C9*2}$$

$$Cl = \theta_1 \times \theta_3 \times \exp \eta_1 \text{ pour le génotype CYP2C9*3}$$

Les covariables suivantes ont été testées sur les paramètres pharmacocinétiques du modèle : âge, poids, sexe, BMI, BSA, génotype CYP2C9, phénotype 1A2, fumeurs.

Dans l'analyse pharmacodynamique les covariables suivantes ont été évaluées : génotype VKROC1, âge, poids, sexe, BMI, BSA.

Les covariables sont conservées dans le modèle si elles diminuent de façon significative la fonction objective du modèle ($-3,84$ selon une loi de χ^2 ; $p=0,05$), si elles améliorent les graphiques d'ajustements et si la variabilité interindividuelle d'un paramètre est diminuée. Une fois que toutes les covariables d'intérêt ayant une influence sont incluses dans le modèle, une étape inverse de retrait de covariables est effectuée. Les covariables sont retirées une à une du modèle si la fonction objective est modifiée de $+6,63$ (loi de χ^2 ; $p=0,01$). Le résultat de cette procédure permet de déterminer le modèle final.

6.2.7.4 Validation du modèle final

Le modèle final est évalué selon les mêmes principes évoqués dans le paragraphe 2.2.4.1 selon les critères d'ajustement graphiques, la précision des paramètres estimés et la technique de *Visual Predictive Check* [Holford 2005].

6.3 Résultats

6.3.1 Caractéristiques des sujets

Vingt-quatre sujets sains caucasiens (19 hommes, 5 femmes) ont été inclus et ont terminé cette étude. Les sujets étaient âgés en moyenne de 28 ans. Le poids moyen était de 69 kg. Il y avait 5 sujets fumeurs avec une consommation moyenne de 14,7 cigarettes par jour. Deux groupes de volontaires ont été sélectionnés sur les bases de leur génotype CYP2C9. Treize sujets étaient porteurs d'un allèle CYP2C9*3 dont 2 doubles hétérozygotes (CYP2C9*2*3) et 11 patients étaient homozygote CYP2C9*1. Les sujets homozygotes

CYP2C9*2 ont été exclus de l'étude. Concernant le génotype de VKORC1, 5 sujets étaient homozygotes CC, 7 étaient homozygote TT et 12 hétérozygotes CT. L'ensemble des caractéristiques est présenté dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9. Caractéristiques démographiques des sujets (variables continues)

Variable	Moyenne	Ecart-type	Médiane	Minimum	Maximum
Age	28	8,13	24	19	47
Poids	69	10,2	69	51	89
Taille	174	8,0	175	158	185
BMI	23	2,4	23	19	28
Ratio PX/caf	0,47	0,19	0,47	0,19	0,99

Tableau 10. Caractéristiques génotypiques

Variable	Effectif
Sexe (F)	5
CYP2C9*1	11
CYP2C9*2*3	2
CYP2C9*1*3	11
VKORC1 TT	7
VKORC1 CT	12
VKORC1 CC	5

La corrélation entre le phénotype du CYP1A2 et le tabagisme des volontaires est présenté dans la figure 29.

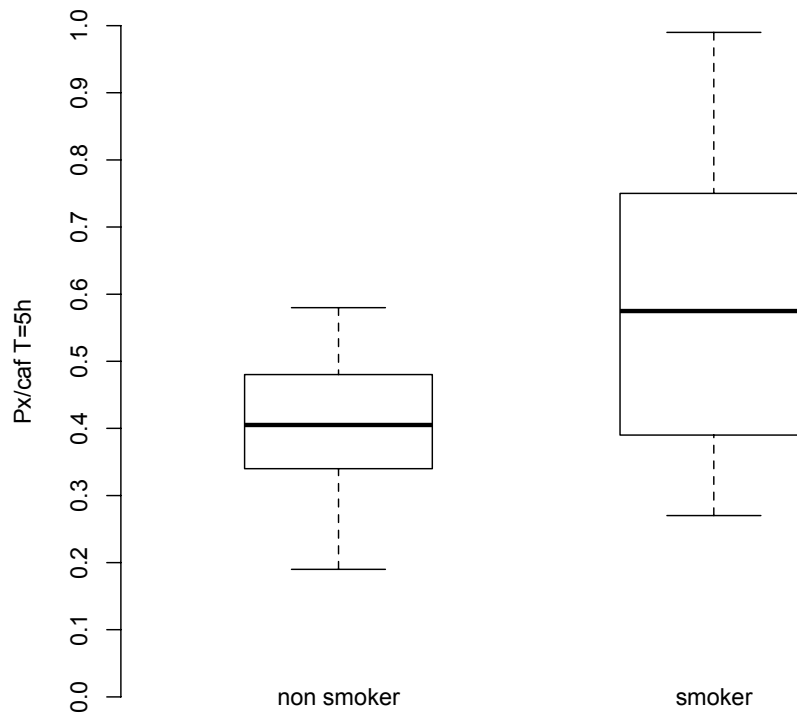


Figure 29. Relation entre le phénotype du CYP1A2 et le tabagisme des volontaires

6.3.2 Construction du modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique de la fluindione

Les concentrations et les effets pour de la fluindione sont présentés sur la figure 27.

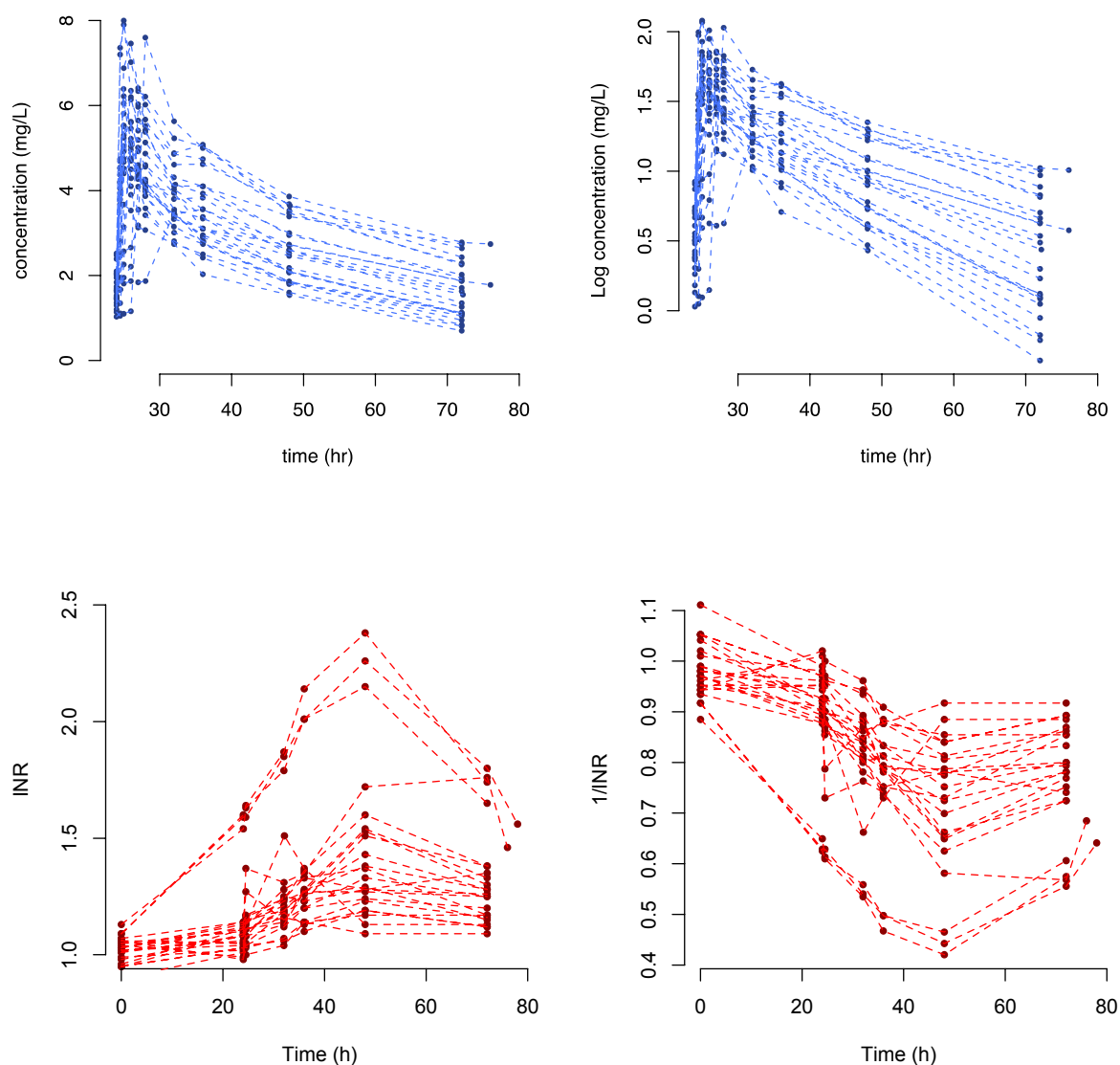


Figure 30. Descriptions des données pharmacocinétiques (bleu) et pharmacodynamiques (rouge) de la fluindione.

Le meilleur modèle structurel pour décrire les données pharmacocinétiques de la fluindione était un modèle à 2-compartiments avec une absorption d'ordre-1 sans délai d'absorption. Dans ce modèle, la clairance apparente (Cl/F) est de 0,17 L/h et le volume apparent de distribution du compartiment central (V_c/F) est de 5,4 L. Aucune covariance n'est retrouvée entre les paramètres. On retrouve une variabilité interindividuelle sur tous les paramètres sauf la clairance inter-compartimentale (Q). Le modèle d'erreur est de type proportionnel.

Les covariables qui ont permis d'expliquer une partie de la variabilité de la clairance étaient le génotype du CYP2C9 et le phénotype du CYP1A2. Une fois ces 2 covariables incluses dans le modèle la variabilité interindividuelle de la clairance diminuait de 37,7 à

13,1% (CV). Le poids des sujets sur le volume de distribution du compartiment central a permis de réduire la variabilité interindividuelle de ce paramètre de 13,2 à 4,2%.

La relation pharmacocinétique et pharmacodynamique est décrite par un modèle de réponse indirect (inhibition de la réponse) avec un coefficient de sigmoïdité. Une variabilité interindividuelle a été estimée pour les paramètres C_{50} et k_{syn} . Le modèle d'erreur est de type additif. La seule covariable incluse dans le modèle est le génotype de VKORC1 sur C_{50} ce qui a permis de réduire la variabilité interindividuelle de 32 à 27,1%.

L'ensemble des paramètres du modèle est présenté dans le tableau 11. Les graphiques d'ajustements aux données montrent une bonne performance du modèle sans présence de biais (figure 31). La validation du modèle par Visual Predictive Check montre que la majorité des observations (95% pour la PK ; 94% pour la PD) sont comprises dans l'intervalle de 90% des simulations (figure 32).

Tableau 11. Paramètres PK/PD de la fluindione

	paramètre	r.s.e.(%)	p-value
ka	2.02	27	

$Cl = \theta \times \theta^{\text{poids}} \times \theta^{\text{CYP2C9}} \times \theta^{\text{CYP1A2}}$	0.172	7	
θ^{poids}	1.17	24	2.40E-05
θ^{CYP2C9}	-0.374	22	8.00E-06
θ^{CYP1A2}	0.599	19	9.50E-08
$V1 = \theta \times \theta^{\text{poids}}$	5.38	5	
θ^{poids}	0.903	24	4.50E-05
Q	0.182	32	
V2	2.51	22	
$C50 = \theta \times \theta^{\text{VKORC1}}$	3.61	12	
θ^{VKORC1}	0.281	48	0.038
k_{syn}	0.0373	12	
k_{deg}	0.0379	12	
N	2.32	15	
η_{ka}	1.62	30	
η_{Cl}	0.0171	66	
η_{V1}	0.00184	383	
η_{Q}	0.327	96	
η_{V2}	0.0464	274	
η_{C50}	0.0736	36	
$\eta_{\text{k}_{\text{syn}}}$	0.00171	53	
$\eta_{\text{k}_{\text{deg}}}$	0 FIX	-	
η_{N}	0 FIX	-	
Erreur proportionnelle PK	0.163	5	
Erreur additive PD	0.046	7	

θ correspond à la valeur typique d'un paramètre pour la population ; η correspond à la variabilité inter-individuelle du paramètre de population ; r.s.e correspond à la précision des paramètres en %

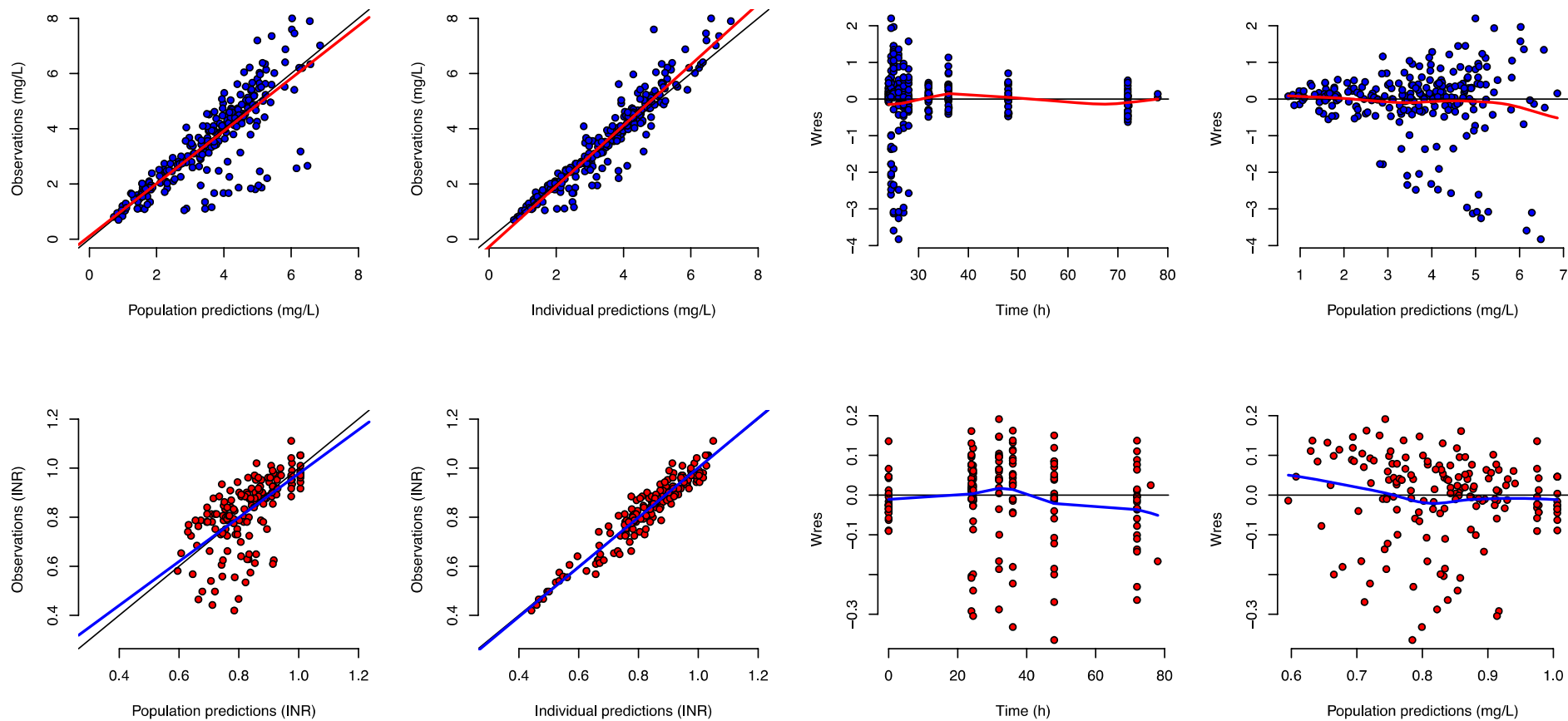


Figure 31. Paramètres PK (bleu), PD (rouge) d'ajustements graphiques du modèle

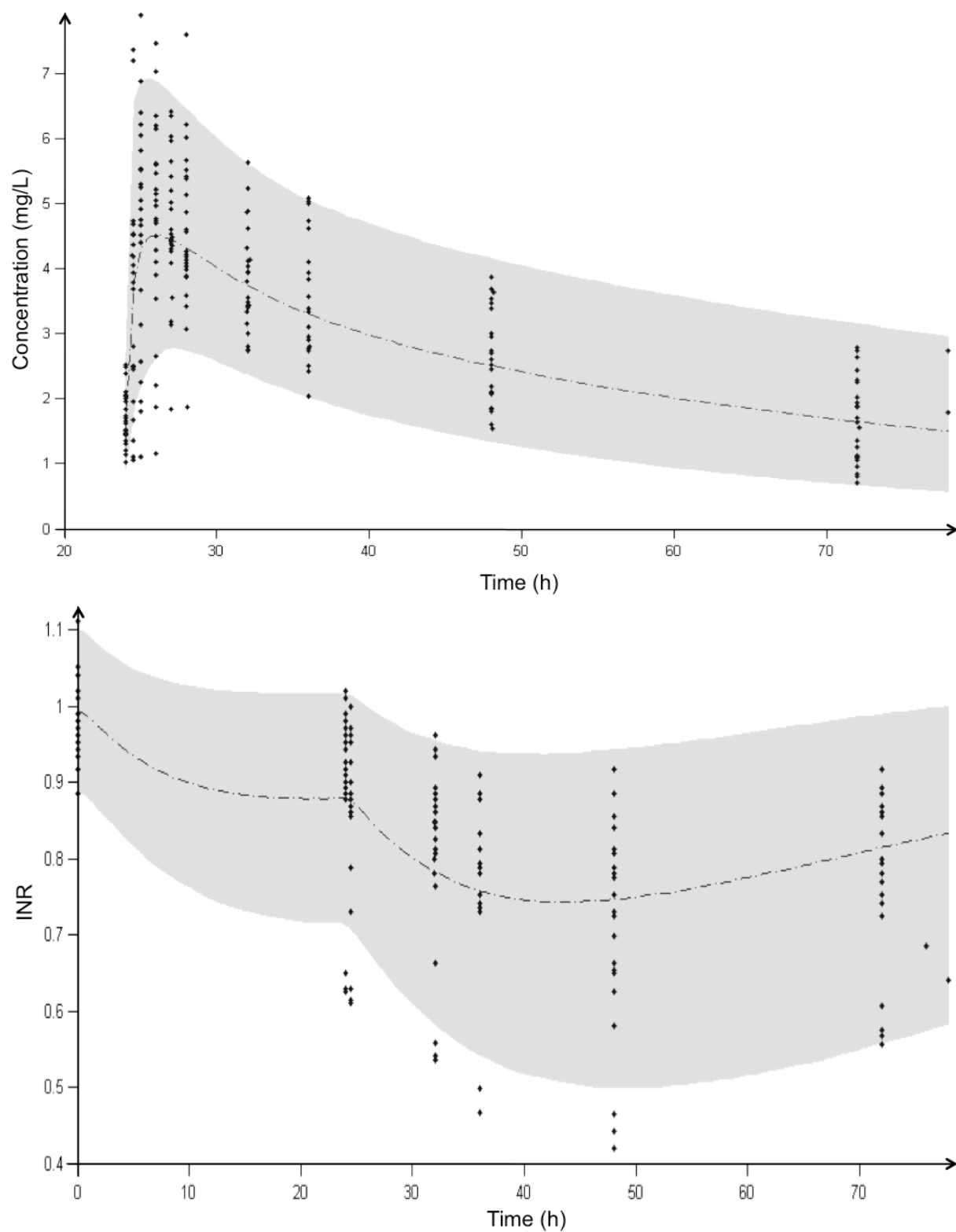


Figure 32. Visual Predictive Check PK (A) et PD (B)

Les points représentent les observations ; l'enveloppe grise représente l'intervalle de 90% des simulations ; la ligne pointillée représente la médiane des simulations

6.3.3 Modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique de l'acénocoumarol

Dans un premier temps les modèles pharmacocinétiques de chaque énantiomère R- et S-acénocoumarol a été construit à partir des données présentées en figure 33.

Seul le modèle pharmacocinétique du S-acénocoumarol sera décrit car la construction du modèle d'interaction de cet énantiomère a démontré son activité sur les fluctuations de l'INR [Thijssen 2000; Thijssen 2001]. La pharmacocinétique du S-acénocoumarol était bien décrite par un modèle à 2-compartiments avec une absorption d'ordre-1 avec un délai d'absorption. Dans le modèle final, la clairance du S-acénocoumarol est de 15,3 L/h et le volume apparent du compartiment central est de 26,6 L. On retrouve une variabilité interindividuelle pour tous les paramètres sauf la clairance inter-compartimentale (Q). Le modèle d'erreur est de type proportionnel. Le modèle de réponse indirecte a été utilisé pour décrire la relation PK/PD entre les concentrations de S-acénocoumarol et l'INR. Seuls les paramètres de C_{50} et k_{syn} possèdent une variabilité interindividuelle. L'erreur pharmacodynamique est décrite par un modèle additif. Trois covariables ont permis d'expliquer une partie de la variabilité. Le génotype de CYP2C9 sur la clairance a permis de réduire la variabilité interindividuelle de ce paramètre de 42 à 24,7%. Le poids sur le volume de distribution a permis de diminuer la variabilité de 72,6 à 23,9%. La seule covariable explicative sur la partie pharmacodynamique est le génotype de VKORC1 sur la C_{50} avec une réduction de la variabilité interindividuelle de 140 à 108%. L'ensemble des paramètres est décrit dans le tableau 12. Les critères d'ajustement graphique représenté dans la figure 34 ne montrent pas de biais particulier.

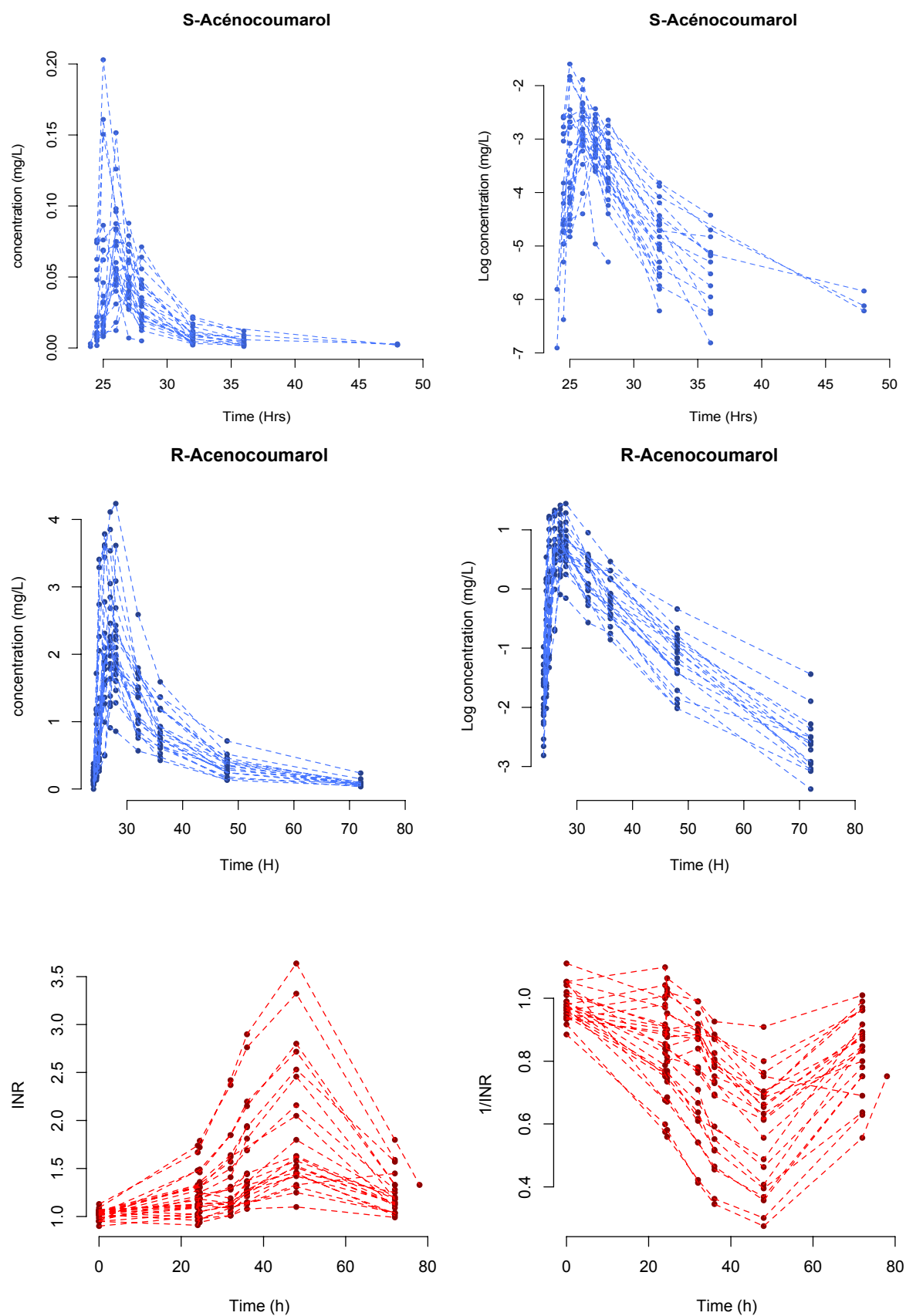


Figure 33. Descriptions des données PK (bleu) et PD (rouge) de l'acénocoumarol

Tableau 12. Paramètres du modèle PK/PD du S-acénocoumarol

Paramètre	Valeur	r.s.e. (%)	p-value
Tlag (h)	0.269	17	
Ka (h ⁻¹)	0.936	14	
Cl (L/h)	15.3	9	
θ_{Cl}^{CYP2C9}	-0.3	41	0.015
V1 (L)	26.6	12	
θ_{V1}^{poids}	1.24	56	0,044
Q (L/h)	4.85	13	
V2 (L)	35.5	30	
C50 (mg/L)	0.00265	55	
θ_{C50}^{VKORC1}	1.29	47	0.034
k _{syn} (h ⁻¹)	0.0269	12	
k _{deg} (h ⁻¹)	0.0268	12	
N	1.2	10	
η_{Tlag}	0.225	59	
η_{ka}	0.374	34	
η_{Cl}	0.0609	43	
η_{V1}	0.0573	113	
η_Q	0 FIX	-	
η_{V2}	0.51	77	
ω_{C50}	1.18	43	
$\eta_{k_{syn}}$	0.00106	161	
$\eta_{k_{deg}}$	0 FIX	-	
η_N	0 FIX	-	
Erreur proportionnelle PK	0.415	7	
Erreur aditive PD	0.0799	7	

θ correspond à la valeur typique d'un paramètre pour la population ; η correspond à la variabilité inter-individuelle du paramètre de population ; r.s.e correspond à la précision des paramètres en %

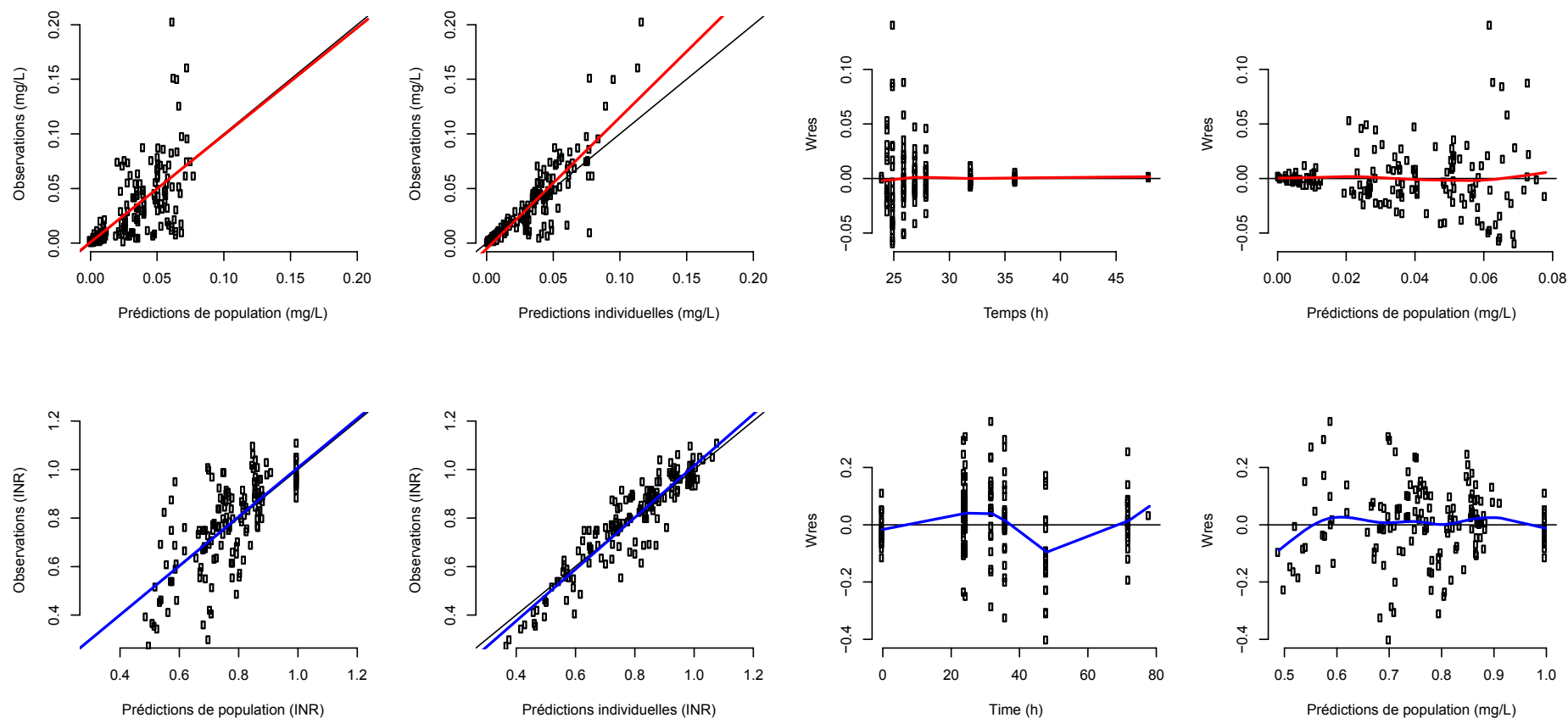


Figure 34. Ajustements graphiques du modèle aux données PK (bleu) et PD (rouge)

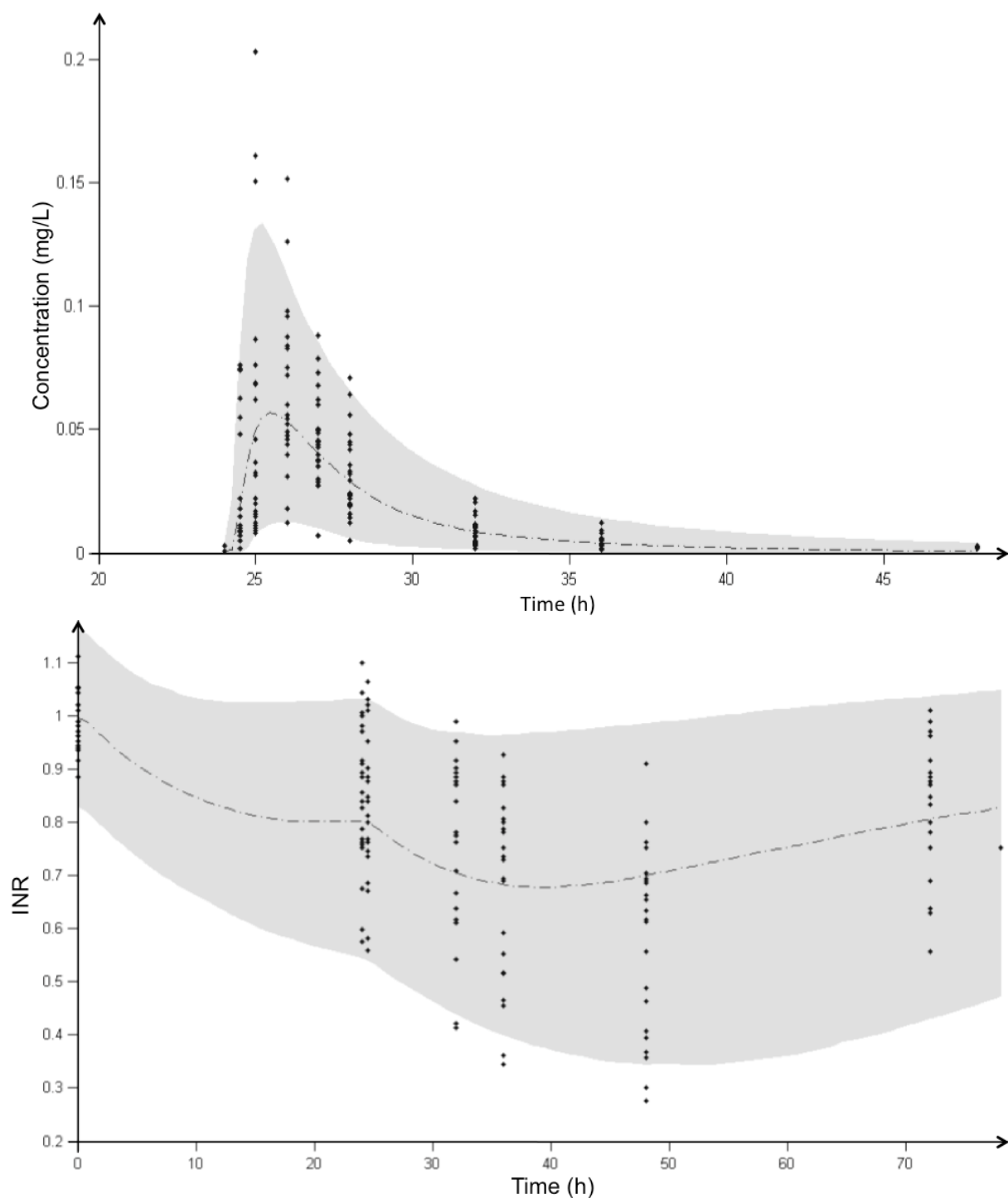


Figure 35. Visual Predictive Check PK/PD du S-acénocoumarol

Les points représentent les observations ; l'enveloppe grise représente l'intervalle de 90% des simulations ; la ligne pointillée représente la médiane des simulations

Validation du modèle

Les paramètres d'ajustement graphique présenté en figure 35 montrent les bonnes prédictions et l'absence de biais du modèle. L'évaluation du modèle par *Visual Predictive Check* montre que 93% des données pharmacocinétique et 91% des données pharmacodynamiques sont compris dans l'intervalle de à 90% des simulations et démontre ainsi ses bonnes performances.

6.3.4 Apports des MNLEM dans cette étude

L'utilisation des MNLEM dans cette étude a permis de réaliser des simulations de l'INR à l'état d'équilibre sous fluindione et acénocoumarol. Différents profils d'évolution de l'INR en fonction du temps ont été évalués pour chacune des covariables, ou combinaisons de covariables, intégrées dans le modèle final. Toutes les simulations ont été réalisées avec le logiciel MONOLIX à partir des estimations de paramètres précédemment réalisées. Pour estimer l'état d'équilibre de l'INR, après une initiation de traitement, nous avons réalisé les simulations pour 20 doses d'acénocoumarol ou de fluindione.

Pour la fluindione, les profils d'INR obtenus pour 20 doses de 20 mg sont présentés sur la figure 36. la figure 36A représente l'effet du génotype CYP2C9, la figure 36B l'effet de VKORC1, la figure 36C l'effet du poids et la figure 36D l'effet du phénotype CYP1A2 en fonction de la classification fumeur des patients. D'après ces simulations, les poids et le génotype du CYP2C9 sont deux prédicteurs importants du niveau de l'INR.

Pour l'acénocoumarol, la figure 37, représente les prédictions du niveau d'INR après 20 doses de 4 mg d'acénocoumarol. La Figure 37A représente l'effet du génotype CYP2C9, la figure 37B l'effet du poids, la figure 37C l'effet du génotype VKORC1 et la figure 37D l'effet combiné du génotype CYP2C9 et de VKORC1. D'après ces simulations l'effet du génotype CYP2C9 semble le plus important sur le niveau de l'INR a l'équilibre.

Les effets des différentes covariables sur la fluindione et l'acénocoumarol et leur conséquence sur l'INR sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13. Résumé de l'effet des covariables sur l'INR prédit de la fluindione et du S-acénocoumarol à l'équilibre.

Covariable	INR_{max} fluindione	INR_{max} acénocoumarol
CYP2C9*1*1 Poids 69 kg Ratio 0.42 VKORC1 TT	2.9	2.6
CYP2C9*1*3 et VKORC1 TT	2.2	1.6
CYP2C9*1*3 ou *2*3 et VKORC1 TT	5.4	4.1
CYP2C9*1*3 ou *2*3 et VKORC1 CT or CC	3.7	1.9
Px/caf non fumeur	3.1	2.6
Px/caf fumeur	2.2	
poids 50 kg	4.0	2.4
Poids 90 kg	2.0	2.8

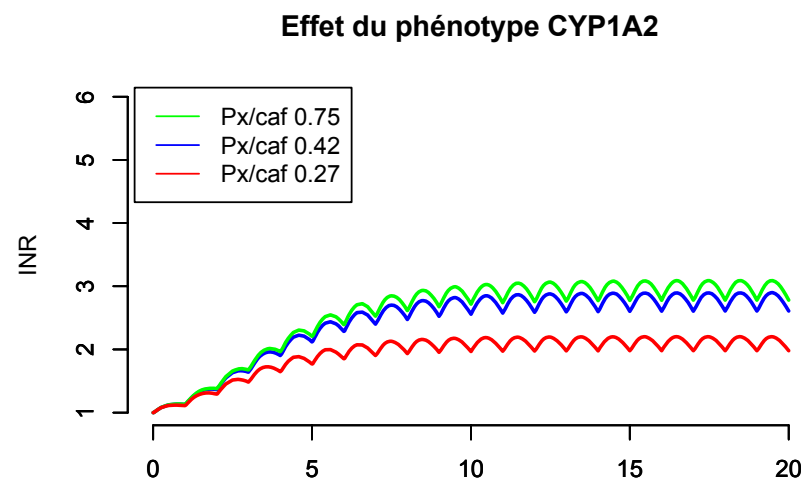
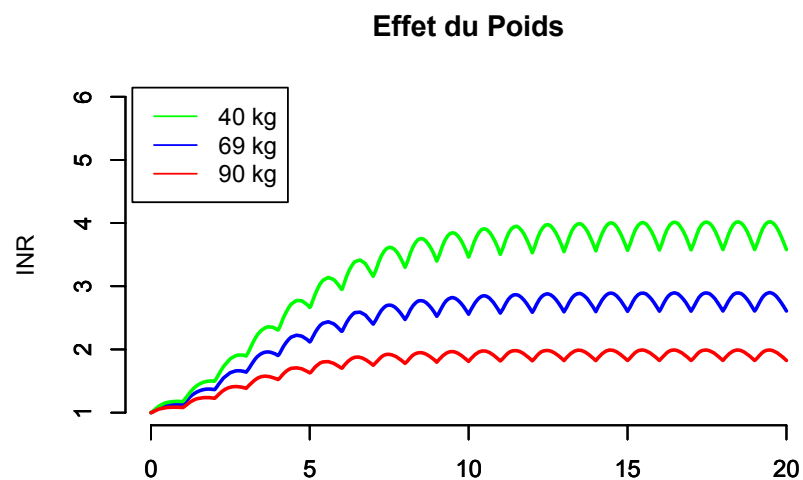
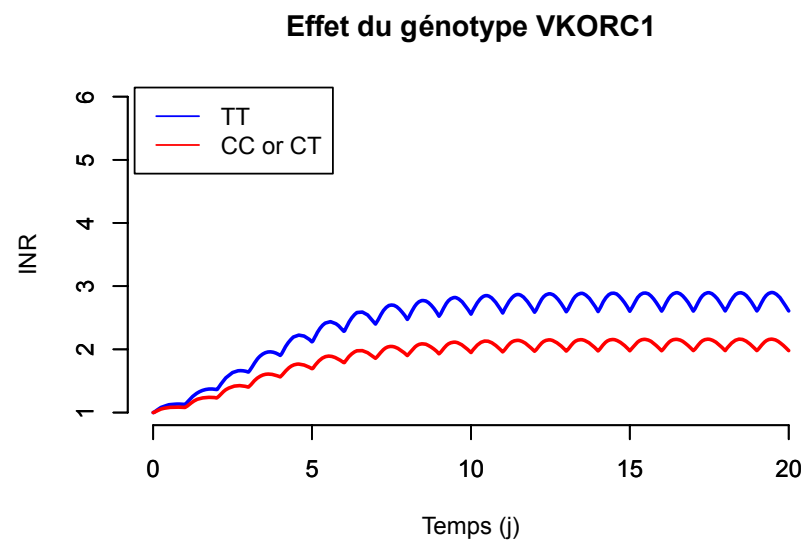
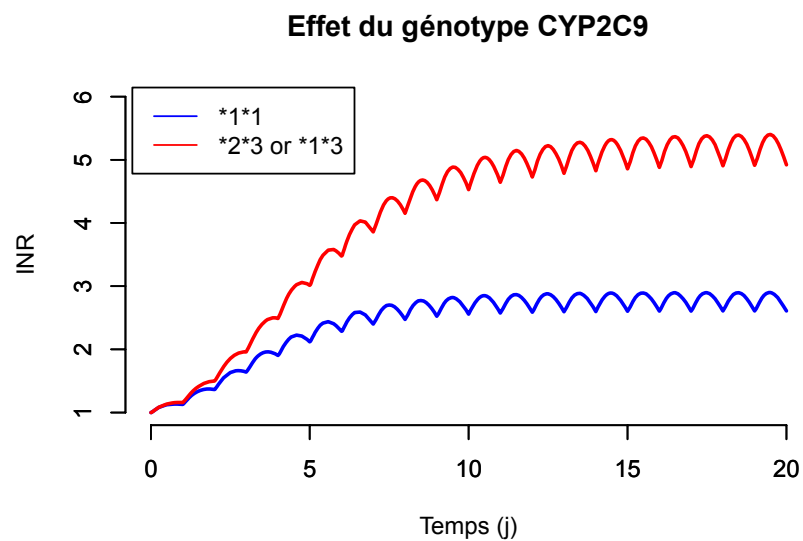


Figure 36. Simulation des l'effet des covariables sur l'INR de la fluindione

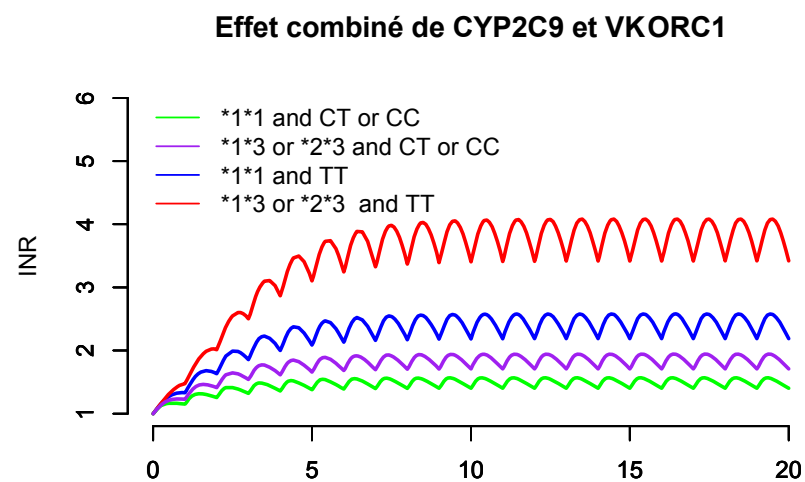
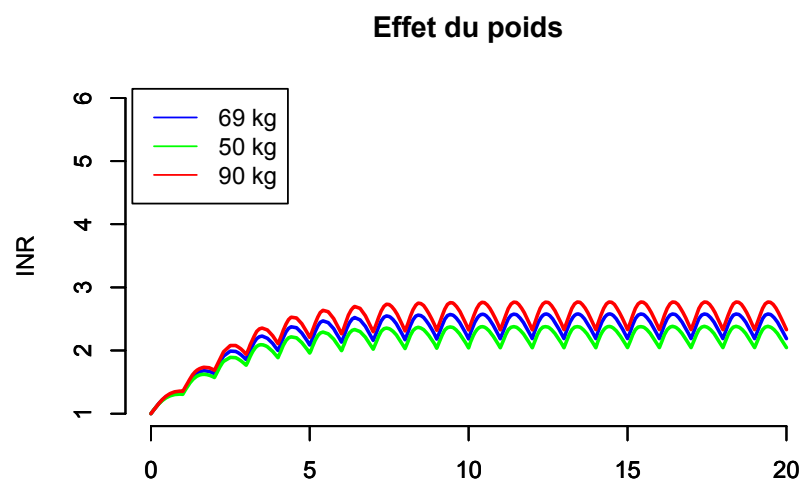
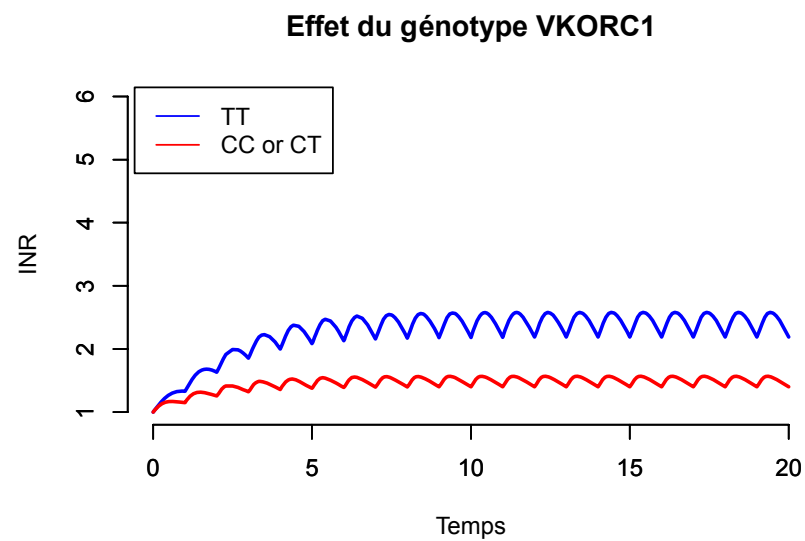
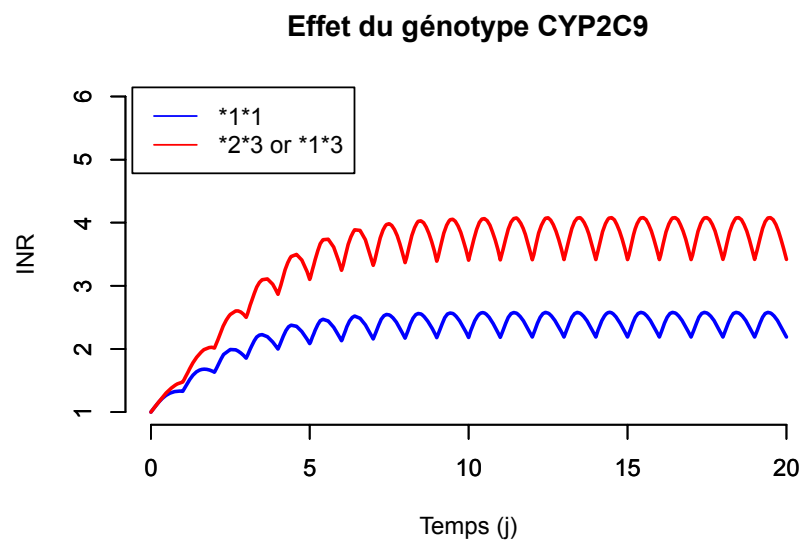


Figure 37. Simulation de l'effet des covariables sur l'INR de l'acénocoumarol.

6.4 Discussion des résultats de cette étude

En raison de sa très large diffusion mondiale, la warfarine a fait l'objet de nombreuses études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. L'acénocoumarol et la fluindione, qui constituent une exception française, font l'objet de beaucoup moins d'investigation, en particulier concernant l'étude de l'influence des polymorphismes génétiques. Notre objectif était d'évaluer l'influence des polymorphismes du CYP2C9 et de VKORC1 sur la pharmacocinétique et pharmacodynamique de la fluindione et de l'acénocoumarol.

Nous avons réalisé, dans cette étude, les premières descriptions complètes de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie du S-acénocoumarol et de la fluindione en tenant compte des principaux polymorphismes d'intérêt. Les concentrations de S-acénocoumarol ont été décrites par un modèle à 2-compartiments et une absorption d'ordre-1. La partie pharmacodynamique correspond à un modèle de réponse indirect. Une seule étude avait déjà décrit la pharmacocinétique/pharmacodynamique de l'acénocoumarol, mais sans faire la distinction entre les 2 énantiomères [Delavenne 2009]. Pour la fluindione, il s'agit de la première description avec des données riches. Une précédente étude réalisée par Mentré et coll, a décrit le premier modèle PK/PD pour 6 doses de fluindione administrées chez 49 patients [Mentré 1998]. Dans cette étude, seulement 9 prélèvements étaient recueillis sur une durée de 6 jours : ce plan de prélèvement « épars » avait permis de décrire un modèle pharmacocinétique simple à 1 compartiment, alors que nous avons décrit un modèle à 2 compartiments avec des données riches, plus adéquates pour identifier les modèles structurels. Les structures des modèles pharmacodynamiques restent identiques.

Le premier résultat important de ce travail est que le polymorphisme génétique du CYP2C9 explique une grande partie de la variabilité de la clairance de l'acénocoumarol et de la fluindione. Le second résultat important concerne l'acénocoumarol, puisque nous avons montré que seul énantiomère S était actif et expliquait les variations de l'INR. Bien que plusieurs éléments étaient en faveur de l'activité du S-acénocoumarol [Thijssen 2001; Beinema 2008], certains auteurs évoquaient l'activité prépondérante de la forme R de l'acénocoumarol sur le principe simple, que les concentrations sont beaucoup plus importantes [Thijssen 2000]. Nous avons montré aussi que les polymorphismes de CYP2C9 expliquaient une partie de la variabilité de la clairance du S-acénocoumarol ce qui confirme son influence sur l'INR (comme cela a déjà été évoqué dans plusieurs travaux) [Thijssen

2001; Thijssen 2003; Verstuyft, Robert, 2003; Ufer 2010]. Le troisième résultat important de ce travail est la mise en évidence de l'influence du phénotype du CYP1A2 sur la clairance de la fluindione. De précédents travaux ont montré que le métabolisme hépatique de la fluindione pouvait être dépendant du CYP2C9 et du CYP1A2 et que l'activité de ces enzymes pouvait influencer la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ce médicament. Notre étude a étudié l'influence de facteurs génétiques, démographiques, mais aussi environnementaux. On montre dans cette étude l'influence du statut fumeurs par l'intermédiaire du phénotype du CYP1A2 (figure 36). En effet les sujets fumeurs sont associés à un phénotype CYP1A2 plus actif (figure 29). Dans les simulations, on montre l'influence du phénotype du CYP1A2 et, en particulier, si on réalise des groupes de phénotype en fonction du statut fumeur. Nous savons que la fumée de cigarette entraîne une augmentation de l'expression de l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments comme le CYP1A2 [Brown 1988; Jennings 1993]. Nous pensons que le CYP1A2 joue un rôle important dans le métabolisme de la fluindione. Cela est appuyé par d'autres publications concernant l'influence du CYP1A2 sur le métabolisme de la R-warfarine [Zhang 1995] et de l'influence du statut fumeur sur la clairance de la warfarine et sur la dose nécessaire pour équilibrer le traitement [Mungall 1985; Millican 2007]. Nos résultats suggèrent que le statut fumeur est un élément important à connaître pour équilibrer un traitement par fluindione. Le dernier résultat important de cette étude concerne l'influence de polymorphisme de VKORC1 sur la variabilité pharmacodynamique de l'acénocoumarol et de la fluindione. Il s'agit du premier travail mettant en évidence un tel résultat alors que cela a déjà été mis en évidence pour la warfarine.

En résumé, 3 covariables sont impliquées dans la variabilité PK/PD du S-acénocoumarol (CYP2C9, VKORC1, poids) alors que 4 sont impliqués pour la fluindione (CYP2C9, poids, CYP1A2, VKORC1). Dans les différentes simulations réalisées en figure 37 et 34 et résumées dans le tableau 13, on observe que l'impact du CYP2C9 serait plus important pour la fluindione que pour l'acénocoumarol. Le génotype VKORC1 ne semble pas être le facteur de variabilité le plus important, même si on retrouve dans les simulations des différences importantes de la réponse. Pour les patients VKORC1 TT, l'INR à l'équilibre est augmenté de 60 et 90% pour l'acénocoumarol et la fluindione par rapport aux sujets porteurs des allèles sauvages.

Ce travail comporte quelques limitations. Il s'agit de modélisation PK/PD chez le volontaire sain et ne correspond pas à la même description des patients traités. De plus, dans cette étude l'état d'équilibre n'était pas atteint. On ne peut exclure que l'influence des polymorphismes soit différente à l'équilibre et pour des patients âgés, insuffisants rénaux ou hépatiques.

Cependant, les résultats des simulations sont cohérents au niveau de l'effet et par rapport aux précédents résultats de la warfarine [Wadelius 2005].

Alors que les AVK sont très utilisés depuis de nombreuses années et qu'ils provoquent un nombre important d'effets indésirables graves, nous venons d'identifier et d'expliquer leurs sources de variabilité majeures. Le génotypage des patients avant l'initiation de traitement anticoagulant par AVK pourrait, à l'avenir, permettre de détecter les patients à risque de saignement. Bien sûr, l'intérêt de ces observations devra être confirmé par des études cliniques chez les patients.

Partie IV : Utilisation des MNLEM pour évaluer des interactions médicamenteuses

7 Etude de l'interaction médicamenteuse entre acénocoumarol et amoxicilline + acide clavulanique

7.1 Introduction

7.1.1 Rappels pharmacologiques de l'amoxicilline + acide clavulanique

L'amoxicilline plus acide clavulanique est une association antibiotique commercialisée sous le nom d'Augmentin®. Cette association à large spectre est la plus fréquemment prescrite de la classe des antibiotiques [Urcam 2001].

Propriétés chimiques

L'amoxicilline (AM) est un antibactérien semi synthétique de la famille des bêta-lactamines et appartenant au groupe des aminopénicillines.

L'acide clavulanique (AC) est produit à partir de *Streptomyces clavuligerus*, sa structure est similaire à certaines bêta-lactamines comme les pénicillines et possède la capacité d'inactiver les bêta-lactamases sécrétées par certaines bactéries.

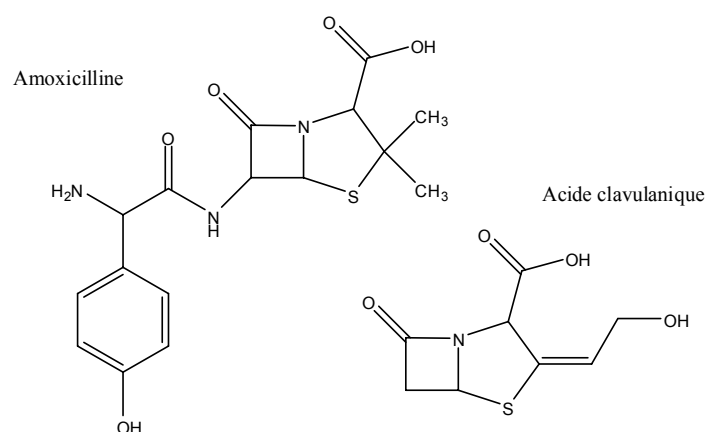


Figure 38: Structures chimiques de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique

Propriétés pharmacocinétiques

Chacun des deux composants de cette association antibiotique montre sensiblement les mêmes caractéristiques pharmacocinétiques.

- *Absorption*

L'AM et AC sont administrés par voie orale et possèdent un profil d'absorption semblable. La biodisponibilité de l'AM est de 90%, celle de l'AC est de 60 à 75%.

- *Distribution*

Les pics sériques d'amoxicilline sont obtenus entre 1 et 2 heures après administration, ceux de l'acide clavulanique entre 50 et 100 minutes. La diffusion simultanée est du même ordre de grandeur pour chacun des deux composants dans la plupart des tissus et milieux biologiques. Le taux de fixation aux protéines plasmatiques est de 17% pour l'AM et de 22% pour AC.

- *Métabolisation*

L'AM et AC sont très faiblement métabolisés.

- *Elimination*

L'AM et AC sont éliminés majoritairement sous forme inchangée dans les urines. Pour l'AC on estime que 40 à 60 % de la dose administrée est éliminée sous forme inchangée.

Propriétés pharmacodynamiques

L'amoxicilline plus acide clavulanique est couramment utilisée dans le traitement des infections à germes sensibles, en particulier dans les infections respiratoires, ORL et urinaires.

- L'amoxicilline agit en interrompant le processus de transpeptidation qui lie les protéoglycanes de la membrane bactérienne. Les bêta-lactamines se lient et inactivent des cibles enzymatiques situées sur la paroi interne de la membrane bactérienne: les protéines de liaison des pénicillines (transpeptidases, carboxypeptidases, endopeptidases). L'inactivation de ces protéines provoque la mort cellulaire [Tipper 1985].

- L'acide clavulanique est particulièrement efficace sur les bêta-lactamases médiées par les plasmides qui sont à l'origine des résistances aux pénicillines et aux céphalosporines en bloquant leurs sites actifs.

7.1.2 Contexte

De très nombreuses interactions médicamenteuses sont rapportées dans le dictionnaire Vidal® mais l'interaction Amoxicilline-AVK n'y figure pas [Udall 1965; Shearer 1988; Affsaps 2008]. La littérature rapporte cependant plusieurs cas d'hémorragies sous amoxicilline plus acide clavulanique ainsi qu'une étude prospective cas-témoin qui associe le risque d'exposition au traitement antibiotique à un INR supérieur à 6 [Soto 1993; Wood 1993; Bandrowsky 1996; Penning-van Beest 2001; Davydov 2003; Cauli 2004]. Des mécanismes d'interaction au niveau pharmacodynamique ont déjà été proposés. L'association antibiotique serait à l'origine d'une diminution des apports en vitamine K par destruction de la flore microbienne intestinale et, par conséquent, renforcerait l'effet des médicaments anti-vitamine K. Aucun mécanisme d'origine pharmacocinétique n'a été encore proposé puisque la mesure des concentrations sanguines pour le suivi thérapeutique des AVK n'est pas réalisée en pratique quotidienne et repose uniquement sur la mesure de l'INR.

7.1.3 Objectif de l'étude

Pour mettre en évidence cette interaction nous avons mené une étude clinique de phase I chez le volontaire sain. Cette étude en deux phases visait à déterminer si l'ajout d'amoxicilline plus acide clavulanique modifiait la pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamie de l'acénocoumarol. L'analyse des données par approche de population avait pour but de modéliser les concentrations, les effets, de leurs variabilités interindividuelles ainsi que d'estimer les paramètres individuels PK et PD.

7.2 Patients et méthodes

7.2.1 Apports des MNLEM dans cette étude

Détection des interactions médicamenteuses

L'approche non compartimentale, basée sur les études de bioéquivalence, est limitée pour évaluer une interaction médicamenteuse [FDA 1997, 1999; EMEA 2000; Tucker 2001]. Elle repose uniquement sur l'analyse d'un critère pharmacocinétique sans évaluation des

conséquences pharmacodynamique. De plus, ces études ne donnent pas d'explication sur le type de mécanisme impliqué dans une interaction médicamenteuse. Les modèles non linéaires à effets mixtes proposent d'autres solutions pour évaluer une interaction médicamenteuse et permettent surtout un gain de puissance. Une première approche consiste à calculer les aires sous la courbe (AUC) individuelles par approximations bayésiennes. La modélisation est séparée pour chaque groupe. Les tests de Student ou de Wilcoxon en séries appariées sont utilisés pour tester la différence des moyennes géométriques des AUC avec et sans traitement associé. Une deuxième approche considère l'effet du traitement associé comme une covariable. Il suffit d'intégrer la variable " traitement concomitant " (présent ou absent) comme covariable sur les différents paramètres du modèle. Pour constater l'effet de la covariable, on se basera sur la baisse significative de la fonction objective du modèle. Une autre approche consiste à comparer l'effet du traitement à zéro à partir d'une adaptation du test de Wald dans le modèle incluant la covariable "traitement" [Kowalski 2001].

7.2.2 Plan expérimental

Il s'agit d'une étude clinique de phase I menée en ouvert chez 8 volontaires sains masculins. Nous avons choisi un plan expérimental où chaque sujet est son propre témoin pour nous affranchir de la forte variabilité inter-individuelle. L'étude comprend 2 périodes de 48 heures (dont 31 heures d'hospitalisation) :

- Période I : Elle débute par la prise unique de 8 mg d'acénocoumarol seul à 8h00 du matin avec 100 ml d'eau à jeun.
- Inter-période : 5 jours. Chaque volontaire suit un traitement de 1g d'amoxicilline et 500 mg d'acide clavulanique deux fois par jour pendant 5 jours.
- Période II : Le premier jour chaque patient reçoit une dose de 8 mg d'acénocoumarol à 8h00 dans les mêmes conditions que la première période puis 1g d'amoxicilline + 500mg d'acide clavulanique à 8h30 et à 20h00. Le deuxième jour les patients reçoivent uniquement 1g d'amoxicilline + 500 mg d'acide clavulanique à 8h00 et à 20h00.

L'ordre des périodes n'a pas été randomisé car, si aucun effet rémanent pharmacocinétique ou pharmacodynamique n'a été montré avec l'acénocoumarol, il n'en est pas de même avec l'amoxicilline et l'acide clavulanique. En effet, ces molécules peuvent être responsables d'atteintes hépatiques retardées (jusqu'à plusieurs semaines après l'arrêt du traitement), pouvant modifier les caractéristiques pharmacocinétiques et

pharmacodynamiques des AVK [Horsmans 1990]. Pour contrôler l'environnement des patients pendant les périodes d'hospitalisation, l'horaire de lever et de coucher, ainsi que l'alimentation, ont été standardisés. Aucun traitement concomitant n'a été autorisé pendant toute la durée de l'étude.

7.2.3 Critères d'inclusion et de non inclusion

Ont été inclus des hommes âgés de 18 à 35 ans avec un poids compris entre 60 et 80 Kg et un bilan biologique normal. Le bilan biologique comprenait une numération formule sanguine, une numération plaquettaire, un dosage des transaminases et des gamma-glutamyl transférases, un temps de céphaline activée, une fibrinogénémie, une sérologie hépatite A, B, C et HIV I- II. Les 8 volontaires sains ont signé un consentement éclairé en accord avec la loi Huriet-Serusiclat du 20 décembre 1988.

Les volontaires ne pouvaient être inclus s'ils présentaient des antécédents de phénomènes hémorragiques spontanés ou non, d'hypersensibilité aux bêta-lactamines, de réactions cutanées à l'acénocoumarol. L'existence d'un traitement durant l'étude et un mois auparavant, l'absence de régime de sécurité sociale et la participation à un autre protocole de recherche clinique dans les 3 mois précédant l'inclusion, étaient des critères de non inclusion.

7.2.4 Traitements étudiés

Le choix de l'acénocoumarol, dans l'étude de l'interaction antivitamine K et amoxicilline plus acide clavulanique s'est fait sur un critère pharmacocinétique. L'acénocoumarol est l'AVK qui possède la plus courte demi-vie (environ 8 heures) ce qui permet d'obtenir des durées d'expérimentation plus courtes.

L'amoxicilline + acide clavulanique a été donné à la posologie de 2 g par jour en deux prises de 2 gélules de 500 mg d'amoxicilline et 250 mg d'acide clavulanique à 8h00 et à 20h00 pendant 7 jours.

7.2.5 Dosages

Pour chaque période de l'étude, 11 prélèvements sanguins ont été réalisés à T = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 13, 24, 31 heures après la prise d'acénocoumarol. Sur chaque prélèvement, les concentrations plasmatiques d'acénocoumarol ont été mesurées par une méthode de chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur colonne C18 Lichrosorb SRP18 15 × 4,6 mm (Chromopack, Middelburg, Pays bas). Les échantillon de plasma ont subi une extraction liquide/liquide par dichlorométhane/éther de pétrole (50:50 v/v). La phase mobile était un mélange d'acide acétique, acétonitrile et de tampon de phosphate de sodium (pH 5, 80 :20 v/v). La limite de quantification était de 15 ng/mL. La reproductibilité et la répétabilité de la méthode étaient inférieures à 10%. Le rendement d'extraction variait de 100 à 105%

Les taux de prothrombine, marqueurs pharmacodynamiques, ont été mesurés par le réactif Thrombotest (Neoplastin Automate Reagent, Diagnostica Stago) par méthode chromométrique.

7.2.6 Analyse non compartimentale

L'interaction a d'abord été étudiée par une approche non compartimentale selon les principes réglementaires. Cette première approche a pour but d'estimer l'interaction avant de procéder à une étape de modélisation. Nous avons calculé les aires sous la courbe (AUC) de l'acénocoumarol de zéro à l'infini, pour chaque patient, par la méthode des trapèzes. Puis, à partir d'une analyse de variance (ANOVA), nous avons déterminé l'intervalle de confiance du rapport des moyenne de l'AUC de l'acénocoumarol en l'absence et en présence d'amoxicilline plus acide clavulanique. L'intervalle de confiance du rapport de la moyenne des AUC a été ensuite comparé à l'intervalle de confiance défini de manière réglementaire (0,8 – 1,25) [FDA 1997, 1999].

$$\bar{X}_{\text{traitement}} - \bar{X}_{\text{référence}} \pm t \sqrt{\frac{2s_e^2}{n}} \quad t_{0,05} (n-2) \text{ ddl pour l'ANOVA}$$

\bar{X} représente la moyenne arithmétique des logarithmes des AUC

En cas de modification de la pharmacocinétique de l'acénocoumarol en présence de l'association antibiotique, nous évaluerons quelle en est la conséquence au niveau clinique.

Pour cela nous testerons la différence entre les deux périodes de l'étude sur un paramètre pharmacodynamique représentatif : AUC du TP. Chaque AUC sera mesurée par la méthode des trapèzes et le test de Student en séries appariées sera effectué.

7.2.7 Modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique

Des modèles mathématiques classiques ont été ajustés aux données : modèle compartimental pour les données pharmacocinétiques, modèle de réponse indirecte pour l'analyse pharmacocinétique/pharmacodynamie.

7.2.7.1 Modèle pharmacocinétique

En l'absence de données sur la structure du modèle de l'acénocoumarol dans la littérature, nous avons testé différents modèles : un modèle à un compartiment et un modèle à deux compartiments après administration orale, avec et sans temps de latence. Les paramètres pharmacocinétiques du modèle à un compartiment sont : la constante de vitesse d'absorption (K_a), la clairance (Cl) et le volume de distribution du médicament (V_1). Pour le modèle à deux compartiments, il existe trois paramètres supplémentaires : le volume de distribution du compartiment périphérique (V_2), la clairance inter-compartimentale (Q).

Néanmoins, avec 8 patients, il était difficile de déterminer de façon fiable la structure du modèle et nous avons été rapidement confrontés à une sur-paramétrisation du modèle. Nous avons donc eu recours à des données pharmacocinétiques issues d'autres études afin de réaliser cette étape de détermination du modèle.

Etablissement du modèle structurel par méta-analyse de données pharmacocinétiques

Malgré le plan de prélèvement riche de notre étude (9 prélèvements en 24 heures) les données ne nous sont pas apparues suffisantes pour déterminer avec certitude le modèle structurel de l'acénocoumarol. Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'étude comportant une analyse compartimentale des données pharmacocinétiques chez le sujet sain qui nous permette d'identifier la structure du modèle. Nous avons donc réalisé une méta-analyse de données pharmacocinétiques chez des volontaires sains ayant reçu de l'acénocoumarol. Lors d'études précédentes, il a été démontré qu'aucun biais supplémentaire n'était introduit lorsque l'on regroupait des données issues d'études différentes [Laporte-

Simitsidis 2000]. Le modèle structurel ainsi établi a été ajusté aux données des 8 volontaires sains de notre étude.

Estimation pharmacocinétique bayésienne

L'une des possibilités du logiciel NONMEM est de réaliser des prédictions individuelles à partir d'estimation bayésienne. Cette méthode consiste à baser l'estimation des paramètres sur une distribution de probabilité d'un paramètre θ , nommée loi *a priori* du paramètre, et sur une information déterminée par l'observation d'un évènement nommée loi *a posteriori*.

L'option POSTHOC permet, à partir du modèle de population précédemment établi, d'estimer les concentrations et les valeurs des paramètres PK individuels par estimation bayésienne. Les concentrations estimées serviront à évaluer l'ajustement du modèle aux données tandis que les estimations des paramètres PK individuels seront directement utilisées dans le modèle PK/PD.

7.2.8 Analyse pharmacocinétique / pharmacodynamique

En raison de leur mécanisme d'action, la relation effet-concentration des AVK est complexe. Elle décrit une boucle appelée phénomène d'hystérésis qui correspond au décalage dans le temps entre la concentration maximum et l'effet maximum. Il faut donc intégrer le facteur temps dans le modèle pharmacodynamique.

Plusieurs modèles permettent ce type de modélisation. Seul le modèle de réponse indirect a été retenu car il permet de prendre en compte le mécanisme d'action pharmacologique des AVK [Mager 2003]. Les AVK agissent en inhibant la synthèse des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants en bloquant le cycle d'interconversion de la vitamine K. Le modèle par inhibition de la production des facteurs de la coagulation pour le TP correspond au modèle physiologique et est ajusté aux données selon le modèle suivant :

$$\frac{dFC}{dt} = K_{syn} \times \left(1 - \frac{E_{max} \times C}{C_{50} + C} \right) - K_{deg} \times FC$$

$$TP = f(FC)$$

7.2.8.1 Estimation des paramètres

Compte tenu de la complexité du modèle (modèle PK/PD de réponse indirecte) et du nombre relativement important de prélèvement par patient, nous avons utilisé l'algorithme FOCE (First Order Conditional Estimates) centering implémenté dans le logiciel NONMEM pour estimer les paramètres de distribution θ , Ω et σ^2 [Soto 1993].

7.2.8.2 Choix du modèle et intégration des covariables

Le choix du modèle et l'inclusion des covariables se sont déroulés de la même façon que dans la procédure présentée dans le paragraphe 5.2.8.

7.2.8.3 Test de l'interaction médicamenteuse

Pour déceler l'interaction médicamenteuse, il faut mettre en évidence une modification des paramètres PK et/ou PD en présence de l'antibiotique. Pour cela, nous avons introduit dans le modèle PK/PD le traitement comme une covariable, selon la même procédure décrite précédemment. L'interaction médicamenteuse sera suspectée si l'ajout du traitement dans le modèle permet une meilleure prédiction du modèle et qu'elle modifie de façon significative un ou plusieurs paramètres cliniquement pertinents. Les modifications de paramètres doivent se traduire par une modification de l'AUC ou du pic de concentration (C_{\max}) en dehors de l'intervalle 80-120% de la valeur initiale pour être reconnue par les autorités réglementaires [FDA 1997; EMEA 2000].

7.2.8.4 Validation du modèle

La validité interne du modèle a été vérifiée en appliquant la technique de *Visual Predictive Check*. Cette technique consiste à simuler un grand nombre de patients présentant les mêmes caractéristiques et la même distribution de paramètres que ceux étudiés afin de s'assurer que le modèle ainsi estimé est capable de simuler une population incluant les patients observés, donc de les prédire. Pour conclure à la validité du modèle, l'intervalle de 95% des données simulées doit recouvrir les données observées [Holford 2005].

7.3 Résultats

7.3.1 Description de la population

L'étude a inclus 8 volontaires sains. Leurs caractéristiques démographiques et biologiques au moment de l'inclusion sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14. Caractéristiques biologiques des sujets.

Variables	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Age (années)	23.88	3.31	20.00	29.00
Poids (kg)	68.13	8.94	60.00	85.00
Taille (cm)	175.88	7.20	164.00	186.00
BMI (Kg/m ²)	1.822	0.14	1.69	2.06
BSA (m ²)	22.03	2.58	18.52	26.23
TP (%)	88.13	11.18	72.00	100.00
TCA (sec)	32.44	2.85	28.00	37.50
Fibrinogène (g /L)	1.76	0.25	1.40	2.05

BMI (indice de masse corporel), BSA (indice de surface corporel), TP (taux de prothrombine), TCA (temps de céphaline activée)

7.3.2 Analyse non compartimentale

A partir des cinétiques individuelles de l'acénocoumarol et du TP représentées sur la figure 39 nous avons calculé les aires sous la courbe de 0 à l'infini pour chaque sujet par la méthode des trapèzes (tableau 15). La moyenne géométrique des AUC de l'acénocoumarol est de 1854,4 pour la période I et de 2186,4 pour la période II. La moyenne de l'AUC du TP est de 1505,9 pour la période I et de 1315,7 pour la période II.

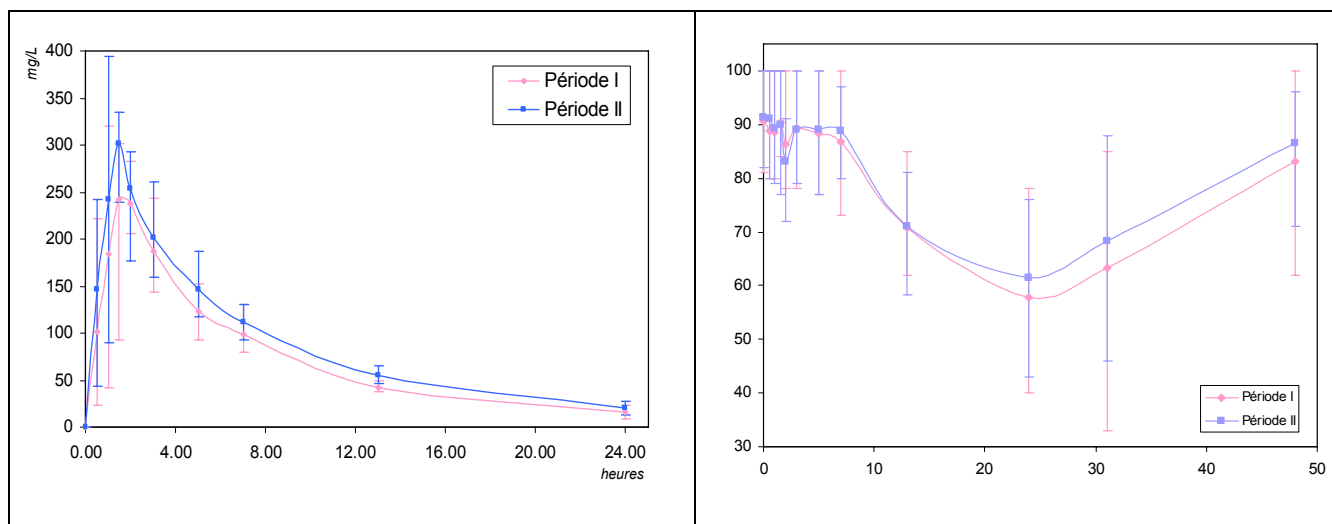


Figure 39. Données pharmacocinétique (concentration acénocoumarol) et pharmacodynamique (Taux de Prothrombine)

Les points représentent la moyenne des mesures pour chaque temps, la barre représente l'écart entre la valeur minimale et maximale pour chaque mesure.

Tableau 15. AUC de l'acénocoumarol (mg/L.h) et du Tp (%.h)

N° Patient	AUC de l'acénocoumarol		ASC du TP	
	Période I	Période II	Période I	Période II
1	1835,2	2272,4	758.2	1114
2	2281,6	2330,1	2173.2	1930.1
3	1686,3	2192,3	1224.2	601.8
4	1553,2	2104,8	588. 3	1188.5
5	1575,8	1932,4	1593.5	1584.9
6	1896,7	2102,6	1344.1	953
7	1607,1	2326,9	1623.2	1523.8
8	2108,9	2009,7	1339	1039

L'analyse de variance sur le logarithme des AUC a été réalisée afin de calculer l'intervalle de confiance (tableau 16).

Tableau 16. ANOVA de l'AUC de l'acénocoumarol

	DF	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F-value	P-value	Lambda	Puissance
Période	1	0,007	0,007	2,736	0,1240	2,736	0,319
Sujet	1	0,001	0,001	0,477	0,5028	0,477	0,095
Période × Sujet	1	2,486E-4	2,486E-4	0,95	0,7629	0,095	0,059
résidus	12	0,31	0,003				

L'intervalle de confiance calculé à partir des ANOVA est représenté graphiquement sur la figure 40 et est comparé à l'intervalle de confiance d'acceptabilité de la bioéquivalence.

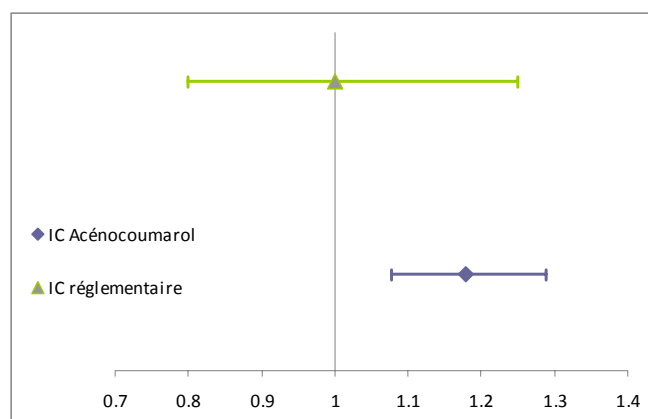


Figure 40. Intervalle de confiance réglementaire (vert) et du rapport des AUC (violet)

Pour tester la significativité de la différence de TP en présence ou en l'absence de l'association antibiotique, nous avons appliqué le test de Student en séries appariées. Le test donne une valeur de $p = 0,12$ (IC -63.7 à 444.1) On peut donc rejeter l'hypothèse de différence du TP avec et sans traitement.

7.3.3 Modélisation pharmacocinétique

7.3.3.1 Identification du modèle pharmacocinétique

L'identification du modèle structurel pharmacocinétique a été réalisée par méta-analyse de données (tableau 17). Le regroupement des données s'est fait à partir de 3 études chez le volontaire sain : une étude de pharmacogénétique incluant 23 sujets, une seconde sur l'étude

d'un marqueur de suivi des AVK avec 8 sujets et enfin les 8 sujets de la première phase de notre étude, sans traitement antibiotique [Mismetti 1998].

Tableau 17. Description des études utilisées dans le regroupement des données

N° de l'étude	Population	Temps de prélèvements	Dose	Caractéristiques des sujets
ETUDE 1 N=8	Volontaires sains	T = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 13, 24, 31	J0 : 8mg	Age : 24 ± 3 [20-29] Poids : 68 ± 9 [60-76] Sexe : 8 hommes
ETUDE 2 N=23	Volontaires sains	T = 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24	J-1 : 4 mg J0 : 4 mg	Age : 27 ± 8 [19-46] Poids : 70 ± 10 [55-89] Sexe : 20 hommes
ETUDE 3 N=8	Volontaires sains	T = 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30	J0 : 12mg	Age : 25 ± 2 [20-26] Poids : 72.5 ± 9 [60-85] Sexe : 8 hommes

Les différents modèles testés représentés dans le tableau 18 nous ont permis de décrire le modèle pharmacocinétique de l'acénocoumarol comme un modèle à deux compartiments avec une administration orale et un lag time (retard d'absorption).

Tableau 18. Modèles pharmacocinétique structurels étudiés

N° et Description du modèle	Caractéristiques du modèle	Variabilité inter-individuelle	Erreur résiduelle	Fonction objective	Valeur de p	Modèle conservé
1 1 compartiment modèle d'erreur mixte	Cl/F 2.02 V/F 24.00 Ka 1.68	42.3% 42.9% 63.0%	0.0305 (a) 42.5% (m)	3485.8		1
2 1 compartiment avec lag time modèle d'erreur mixte	Cl/F 2.00 V/F 22.80 Ka 4.40 Lag 0.47	42.3% 45.5% 130.8% 0 FIX	0.0159 (a) 39.2% (m)	3415.1 (-58.43)	p<0.001	2
3 1 compartiment avec lag time, variabilité inter-individuelle et modèle d'erreur mixte	Cl/F 2.04 V/F 23.70 Ka 3.45 Lag 0.45	61.6% 60.3% 0 FIX 27.2%	3E-11 (a) 8.8% (m)	3445.1 (+30)	NS	2
4 1 compartiment avec lag time, variabilité inter-individuelle et modèle d'erreur multiplicatif	Cl/F 1.99 V/F 22.90 Ka 2.72 Lag 0.43	42.7% 45.1% 0 FIX 36.46%	42.54%	3435.9 (+9.2)	NS	2
5 2 compartiments modèle erreur multiplicatif	Cl/F 2.03 V2/F 13.90 Q/F 0.59 V3/F 7.08 Ka 0.69	43.4% 51.5% 0 FIX 63.7% 54.7%	37.3% (m)	3330.3 (-84.8)	p<0.001*	5
6 2 compartiments avec lag time et modèle erreur multiplicatif	Cl/F 1.61 V2/F 18.10 Q/F 0.49 V3/F 105.00 Ka 3.04 Lag 0.46	59.4% 40.2% 0 FIX 131.9% 115.3% 0 FIX	31.9% (m)	3255.9 (-74.4)	p<0.001	6
7 2 compartiments avec lag time et variabilité inter-individuelle et modèle erreur multiplicatif	Cl/F 2.02 V2/F 14.90 Q/F 0.61 V3/F 6.98 Ka 1.28 Lag 0.39	44.5% 55.0% 0 FIX 71.6% 83.0% 49.4%	27.1%	3202.1 (-53.8)	p<0.001	7
Cl/F = clairance apparente de l'acénocoumarol (L/h) F = biodisponibilité V2/F = volume apparent du compartiment central (L) V3/F = volume apparent du compartiment périphérique (L) Q = clairance inter-compartimentale Ka = constante d'absorption Lag = temps de latence (a) = modèle d'erreur additif (m) = modèle d'erreur multiplicatif p = valeur de p de la différence de fonction objective selon le test du χ^2 p* = valeur de p du critère Akaike selon le test du χ^2						

La représentation des prédictions de la population et les prédictions individuelles par estimations bayésiennes en fonction des concentrations observées (DV) sont présentées dans la figure 41. Cette figure montre que les prédictions individuelles semblent correctes puisque les points sont alignés sur la droite d'identité. Par contre, les prédictions de population sont assez médiocres, et le modèle devrait pouvoir être amélioré.

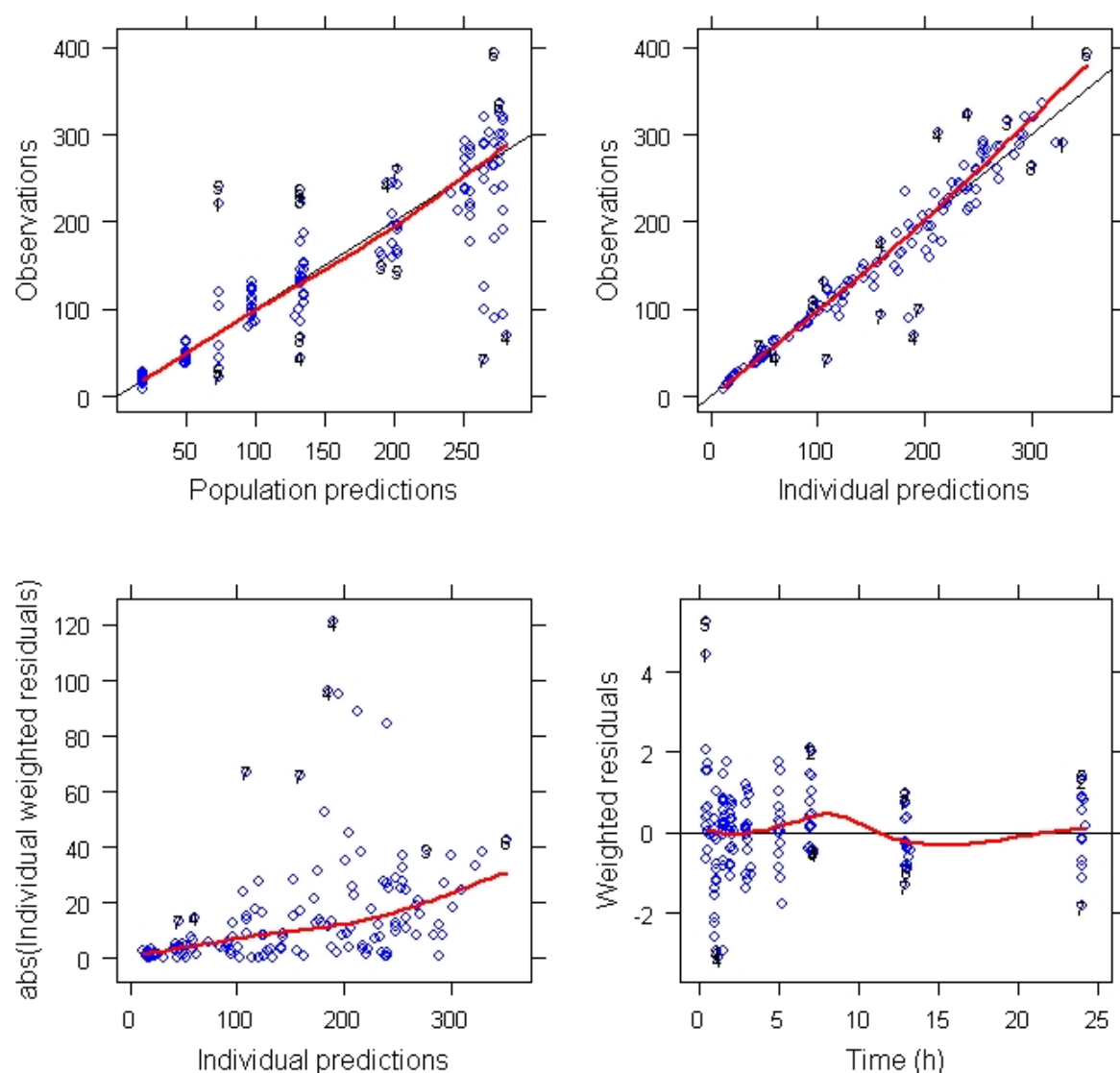


Figure 41. Représentations graphiques d'ajustement de modèle aux données PK

Les cercles représentent les observations ; les courbes rouges représentent une fonction de lissage

7.3.3.2 Intégration des covariables significatives

A partir du modèle de base ainsi établi, nous avons testé les covariables cliniquement pertinentes pouvant expliquer une partie de la variabilité inter-individuelle des paramètres.

Ces covariables comprenaient : l'âge, la taille, le poids et des indices faisant intervenir deux covariables comme l'indice de masse corporelle (BMI) et l'indice de surface corporelle (BSA). Le choix des covariables s'est fait à partir des représentations graphiques des valeurs des paramètres individuels estimés en fonction des caractéristiques biologiques des patients. La procédure d'intégration pas à pas des covariables est décrite dans le tableau 19. Au final nous avons introduit le traitement comme covariable dans le modèle.

La procédure d'élimination des covariables n'a pas permis de simplifier le modèle sans altérer la fonction objective. Toutes les covariables ont été considérées comme significatives. Le meilleur modèle identifié pour décrire les concentrations d'acénocoumarol est celui associant le poids sur le volume central (V2) et le traitement sur la clairance d'élimination (Cl). L'ajout de ces covariables a permis d'expliquer une partie de la variabilité inter individuelle sur le volume central et la clairance de l'acénocoumarol. La clairance d'élimination du médicament est dépendante de la présence d'amoxicilline plus acide clavulanique. Elle est augmentée de 15% en cas d'administration conjointe avec cet antibiotique. Ainsi la demi-vie de l'acénocoumarol se trouve augmentée du même pourcentage en présence d'AM+AC.

Tableau 19. Procédure d'intégration des covariables

N° et Description du modèle	Caractéristiques du modèle	Variabilité inter-individuelle	Erreur résiduelle	Fonction objective	Valeur de p	Modèle conservé
1	Modèle de base	Cl/F 3.75 V2/F 22 Q/F 2.76 V3/F 12.3 Ka 2.86 Lag 0.42	12.2% 10% 0 FIX 30.3% 93.4% 5%	14%	1056.4	1
2	V2/F=04*(poids/médiane poids) ⁰⁷	Cl/F 3.76 V2/F 21.1 Q/F 2.83 V3/F 12.1 Ka 2.9 Lag 0.42	12.4% 5.4% 0 FIX 36.5% 94.8% 2.6%	13.8%	1037.8 (-18.61)	p<0.001 2
3	V2/F=04*(BSA/médiane BSA) ⁰⁷				1040.8 (+3)	NS 2
4	V2/F=04*(taille/médiane taille) ⁰⁷				1036 (-1.8)	NS 2
5	V3/F=04*(taille/médiane taille) ⁰⁸				1034.6 (-3.2)	NS 2
6	V3/F=04*(taille/médiane taille) ⁰⁸				1036.9 (-0.9)	NS 2
7	Ka=05*(poids/médiane poids) ⁰⁹				103 1037	NS 2
8	Cl/F=01 (*08 si TTT)	Cl/F 4.07 V2/F 20.5 Q/F 3.07 V3/F 12.5 Ka 2.78 Lag 0.42	8.7% 0.3% 0 FIX 35.8% 97.1% 2.9%	13.8%	1032.2 (-5.57)	P<0.002 5 8
9	Ka=05 (*09 si TTT)				1032.2	NS 8
Cl/F = clairance apparente de l'acénocoumarol (L/h) F = biodisponibilité V2/F = volume apparent du compartiment central (L) V3/F = volume apparent du compartiment périphérique (L) Q = clairance inter-compartmentale Ka = constante d'absorption Lag = temps de latence (a) = composante additive du modèle d'erreur (m) = modèle multiplicative du modèle d'erreur p = valeur de p de la différence de fonction objective selon le test du χ^2 p* = valeur de p du critère Akaike selon le test du χ^2						

La représentation des prédictions de la population et des prédictions individuelles par estimations bayésiennes en fonction des concentrations observées (DV) sont reportées dans la figure 42. Cette figure montre que les prédictions de population sont meilleures lorsque les covariables sont prises en compte.

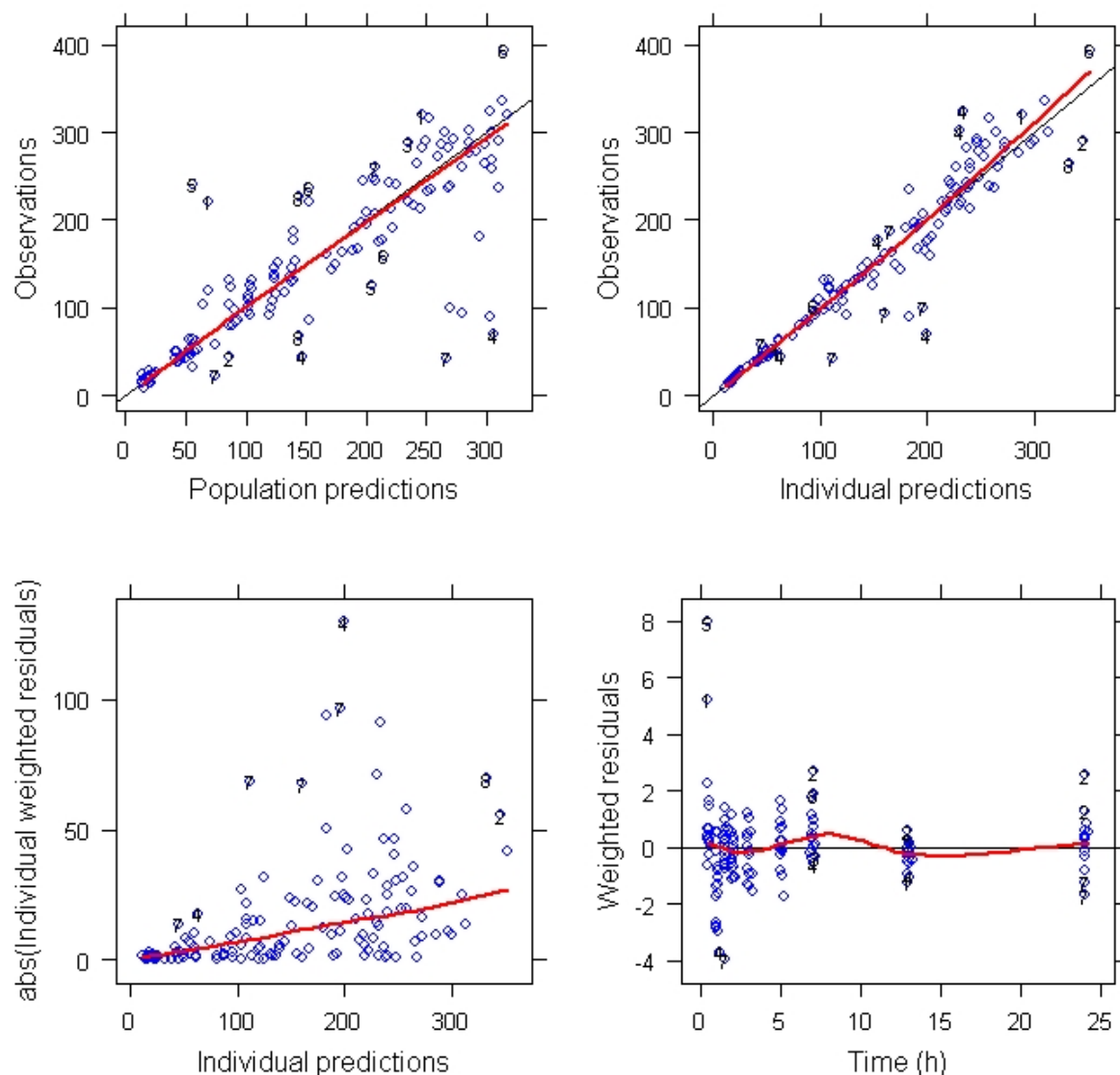


Figure 42. Graphiques d'ajustement du modèle final aux données PK

Les cercles représentent les observations ; les courbes rouges représentent une fonction de lissage

7.3.3.3 Validation du modèle de base

La figure 43 représente les résultats du Visual Predictive Check, permettant de superposer les données pharmacocinétiques observées à l'enveloppe à 95% des valeurs simulées. La majeure partie des observations est comprise entre les 2,5^{ème} et le 97,5^{ème} percentile, montrant que le modèle est apte à prédire les observations.

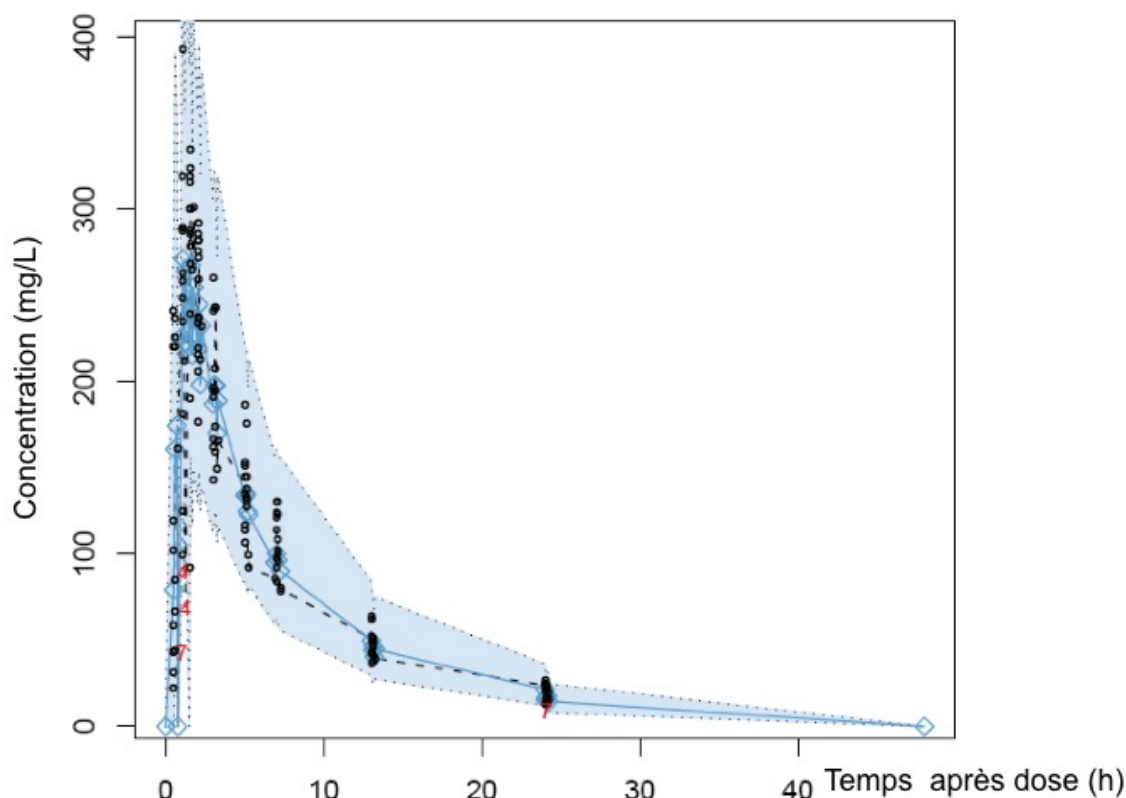


Figure 43. Visual Predictive Check de la PK de l'acénocoumarol

Les cercles noirs correspondent aux observations. L'enveloppe bleue correspond à 95% des simulations, les chiffres rouges aux observations sortant de l'enveloppe de prédiction.

7.3.3.4 Estimations individuelles bayésiennes

Si une interaction pharmacocinétique semble exister entre acénocoumarol et amoxicilline plus acide clavulanique, il est important de s'assurer que cette interaction a des répercussions sur un marqueur d'effet. Ainsi, à partir du modèle intégrant le poids sur le volume central (V2), et l'administration d'amoxicilline plus acide clavulanique sur la clairance, les estimations individuelles bayésiennes ont été déterminées pour tous les sujets à tous les temps afin d'être reliées à la pharmacodynamie.

7.3.4 Modélisation pharmacocinétique - pharmacodynamique

Le modèle PK/PD correspond à l'évolution de l'effet biologique en fonction des concentrations de médicament. Pour optimiser les temps de calcul informatique, les paramètres pharmacocinétiques ne seront pas calculés mais directement implémentés à partir des estimations bayésiennes du modèle PK précédemment établi.

7.3.4.1 Construction du modèle de base

Nous avons testé un modèle de réponse indirecte qui comprenait dans sa partie pharmacodynamique quatre paramètres et deux fonctions hyperboliques. Les paramètres du modèle comprenaient la constante de synthèse (k_{syn}), la concentration qui donne 50% de l'effet maximum (C50), l'effet au temps 0 (E0) c'est-à-dire la valeur initiale du TP et enfin un paramètre intervenant dans la fonction hyperbolique du TP (PT2). Les paramètres k_{syn} et C50 comprenaient une variabilité inter-individuelle. Nous avons utilisé deux fonctions hyperboliques : une fonction intégrée dans le modèle de réponse indirecte pour décrire l'évolution des facteurs de coagulations dans le temps, une autre pour relier le TP aux facteurs de la coagulation. Pour améliorer notre modèle de départ, nous avons testé l'ajout de variabilité inter-individuelle sur E0 et des coefficients de sigmoïdité sur les deux fonctions hyperboliques.

Tableau 20. Construction du modèle structurel PD

N° et Description du modèle	Caractéristiques du modèle		Variabilité inter-individuelle		Erreur résiduelle	Fonction objective	Valeur de p	Modèle conservé
1 Modèle de départ	SYNTH	0.163	SYNT	16.8	(m) 7.6% (a) ~ 0	948.5		1
	C50	1.54	H	%				
	E0	95.4	C50	82.2				
	PT2	0.044		%				
2 Variabilité sur E0	SYNTH	0.259	SYNT	10%	(m) ~ 0 (a) 15.4	819.5 (-129)	p<0.01	2
	C50	0.391	H	60%				
	E0	90.9	C50	6.9%				
	PT2	0.0104	E0					
3 Coefficient de sigmoïdité sur PT						819.5	NS	2
4 Coefficient de sigmoïdité sur C50						819.5	NS	2
5 Coefficient de sigmoïdité et variabilité sur PT						818.3	NS	2
SYNTH = constante de vitesse de synthèse du modèle de réponse indirecte C50 = concentration d'acénocoumarol qui donne 50% de l'effet maximum E0 = effet au temps 0 PT2 = paramètre de la 2 ^{ème} fonction hyperbolique (m)= composante multiplicative du modèle d'erreur (a)= composante additive du modèle d'erreur p = valeur de p de la différence de fonction objective selon le test du χ^2								

Le modèle de base retenu est celui associant une variabilité inter-individuelle sur le E0. Le coefficient de sigmoïdité sur les fonctions hyperboliques du TP et de l'EC50 n'a pas amélioré ce modèle.

La qualité prédictive du modèle est illustrée par la figure 44. Elle montre une bonne performance de notre modèle puisque les points sont bien répartis autour et proche de la diagonale.

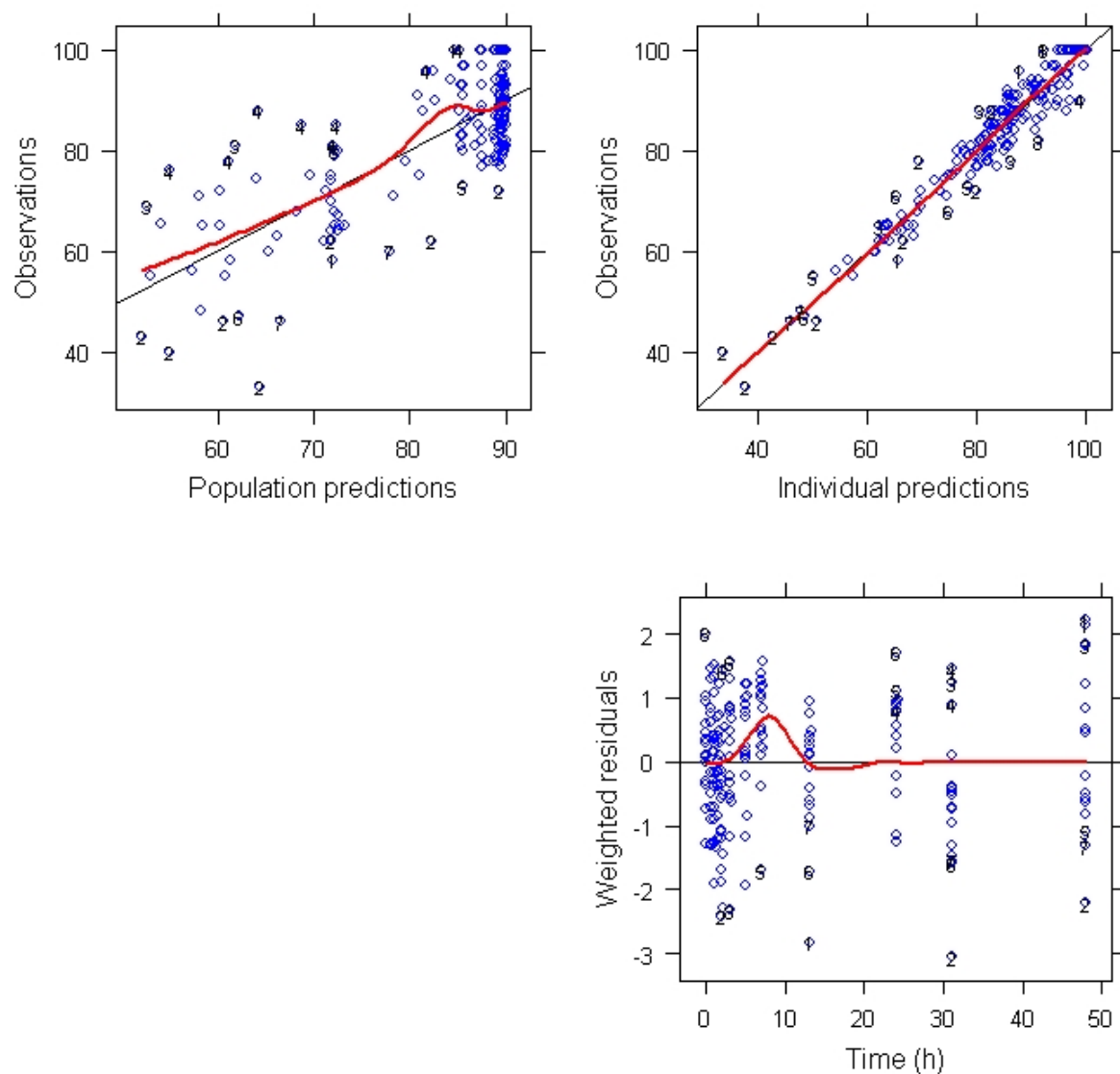


Figure 44. Graphiques d'ajustement du modèle aux données PD

Les cercles représentent les observations ; les courbes rouges représentent une fonction de lissage

7.3.4.2 Elaboration du modèle final et test de l'interaction

Dans l'élaboration du modèle final, nous avons testé l'influence des covariables biologiques sur les paramètres pharmacodynamiques. Aucune covariable biologique n'a apporté une amélioration du modèle. Selon le même principe, nous avons testé l'influence du traitement sur ces paramètres (tableau 21).

Tableau 21. Procédure d'intégration des covariables dans le modèle PD

N° et description du modèle		Caractéristiques du modèle		Variabilité inter-individuelle		Erreur résiduelle	Fonction objective	Valeur de p	Modèle conservé
1	Modèle de base	SYNTH	0.259	SYN	10%	(m) ~ 0 (a) 15.4	819		1
		C50	0.391	TH	60%				
		E0	90.9	C50	6.9%				
		PT2	0.010	E0					
2	C50=02(*07 si TTT)						816	NS	1
3	SYNTH=01*(07 si TTT)						819	NS	1
4	PT=04*(07 si TTT)						818	NS	1
5	E0= 03 (*06 si TTT)						819	NS	1
SYNTH = constante de vitesse de synthèse du modèle de réponse indirecte C50 = concentration d'acénocoumarol qui donne 50% de l'effet maximum E0 = effet au temps 0 PT2 = paramètre de la 2 ^{ème} fonction hyperbolique (m)= composante multiplicative du modèle d'erreur (a)= composante additive du modèle d'erreur p = valeur de p de la différence de fonction objective selon le test du χ^2									

Le traitement ajouté aux quatre paramètres pharmacodynamiques du modèle de réponse indirecte n'a pas modifié de façon significative la fonction objective. Nous ne retenons aucune influence de l'association AM+AC sur la pharmacodynamie de l'acénocoumarol.

7.3.4.3 Validation du modèle

Le résultat de la comparaison du Visual Predictive Check montre que la majorité des valeurs de TP observées est comprise dans l'enveloppe avant et après introduction de la covariable (figure 45).

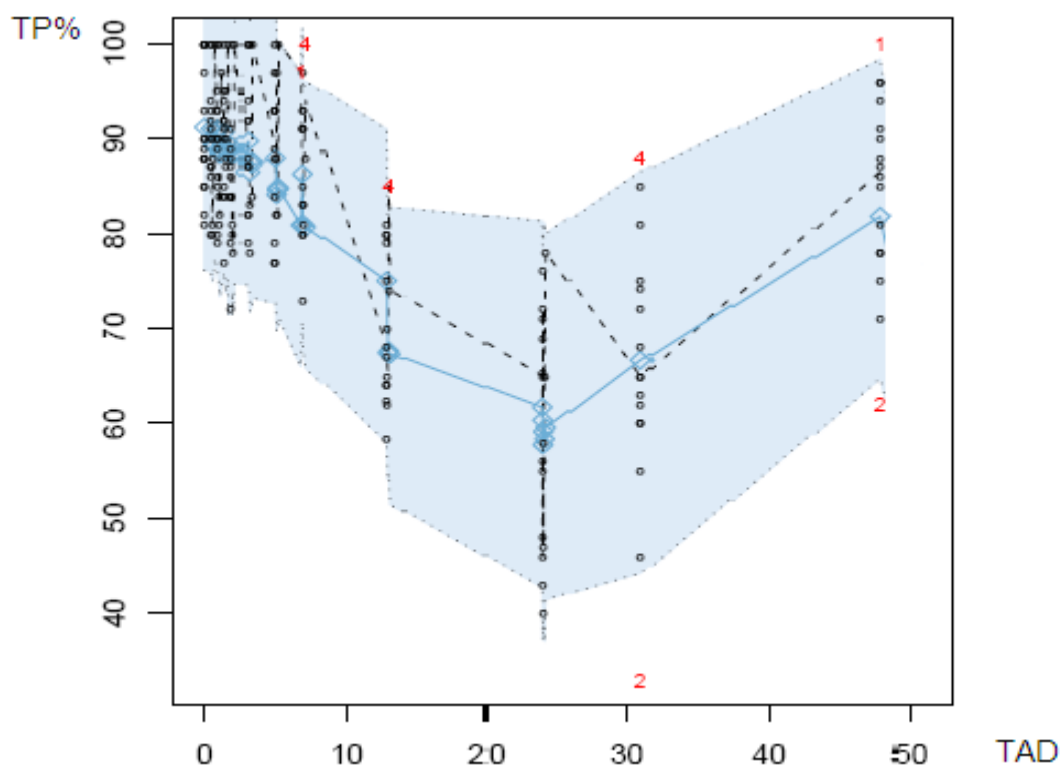


Figure 45. Visual Predictive Check du modèle PD

Les cercles noirs correspondent aux observations. L'enveloppe bleue correspond à 95% des simulations, les chiffres rouges aux observations sortant de l'enveloppe de prédiction.

7.4 Intérêts des MNLEM dans cette étude

L'utilisation de l'approche de population, dans la mise en évidence des interactions médicamenteuses, est en constante progression ces dernières années. Zhou a recensé 78 articles incluant une approche de population dans des études d'interactions médicamenteuses [Zhou 2006]. Il a été montré que cette approche est très puissante notamment dans les essais de type croisé où la stratégie de prélèvement peut être limitée [Panhard 2005]. Cette approche apporte quelques avantages par rapport aux analyses classiques. Contrairement à ces études, les approches de populations donnent des résultats cliniques pertinents et peuvent être directement applicables dans une population cible. Plusieurs interactions médicamenteuses, ou des classes thérapeutiques, peuvent être étudiées dans la même étude. Certains auteurs recommandent cette analyse dans l'étude statistique des effets faibles car elle permet de gagner en puissance [Bauer 1996; Tucker 2001]. Ce type d'approche permet aussi de détecter des interactions non identifiées par les méthodes classiques de confirmer des interactions détectées dans des études *in vitro* et également de mettre en évidence des interactions non suspectées.

7.5 Discussion

L'étude de l'interaction médicamenteuse entre acénocoumarol et amoxicilline plus acide clavulanique a reposé sur deux types d'analyses. Une première analyse non compartimentale basée sur le principe des études de biodisponibilité a permis de montrer une différence de biodisponibilité en présence de l'association antibiotique. La seconde analyse reposant sur la modélisation de la relation PK/PD de l'acénocoumarol a servi de véritable support à l'évaluation de l'interaction par l'introduction de la covariable " effet traitement ", qui a permis d'expliquer une partie de la variabilité. Cette analyse est plus complexe mais plus puissante pour mettre en évidence l'interaction, en particulier pour des médicaments possédant une forte variabilité, comme c'est le cas des AVK.

L'analyse non compartimentale montre une différence significative de l'aire sous la courbe de l'acénocoumarol avec et sans traitement antibiotique. L'intervalle de confiance de ce paramètre compris entre 1,07 et 1,29 sort de l'intervalle de confiance défini pour conclure à la bioéquivalence. Cette différence de biodisponibilité de l'acénocoumarol pourrait être suffisante pour entraîner une modification clinique. Pourtant elle ne semble pas avoir de conséquence effective au niveau pharmacodynamique puisque le test de Student en séries appariées sur le marqueur clinique (AUC du TP) ne se traduit pas par une différence significative.

La modélisation PK/PD confirme les résultats concernant la modification pharmacocinétique de l'acénocoumarol en présence d'amoxicilline plus acide clavulanique. Le changement se traduit par une diminution statistiquement significative de 15% de la clairance apparente de l'acénocoumarol avec pour conséquence une augmentation, dans les mêmes proportions, de l'AUC de l'acénocoumarol. Quoi qu'il en soit, cette interaction pharmacocinétique ne semble pas avoir de conséquence sur la pharmacodynamie de l'acénocoumarol. En effet la covariable « traitement concomitant » n'a pas amélioré la fonction objective du modèle.

Les mécanismes pharmacologiques à l'origine de la diminution de la clairance de l'acénocoumarol ne sont pas évidents puisque les molécules possèdent des profils pharmacocinétiques totalement différents. D'une part, la faible fixation aux protéines plasmatiques de l'amoxicilline plus acide clavulanique (inférieur à 20%) élimine une possible compétition pour la fixation protéique. D'autre part, l'association amoxicilline plus acide

clavulanique est essentiellement éliminée sous forme inchangée dans les urines, excluant ainsi une possible interaction métabolique.

Devant l'absence de mécanisme pharmacologique à l'origine de la modification pharmacocinétique, on peut évoquer un artéfact de l'étude. La modélisation n'est pas exempte de défauts. Cette interaction peut être artéfactuelle, liée aux limites de la modélisation PK/PD. La phase d'absorption (estimée par le paramètre K_a) n'est pas estimée de façon très précise. La variabilité inter-individuelle de ce paramètre présente un coefficient de variation supérieur à 90% dans notre étude. Cependant, cette phase ne modifie ni l'exposition, ni la demi-vie de l'acénocoumarol, et n'est donc pas essentielle pour mettre en évidence l'interaction médicamenteuse. Cette interaction peut être biaisée et liée au plan expérimental de l'étude. En effet, l'interaction est systématiquement testée en seconde période du fait des caractéristiques pharmacologiques de l'antibiotique étudié, et non au cours d'un cross-over avec un tirage au sort des périodes de co-administration. Dans cette hypothèse, l'interaction serait due à un effet période, avec une aire sous la courbe de l'AVK plus importante en seconde période. Ce phénomène paraît discutable, une période de « wash-out » suffisante ayant été laissée entre les deux administrations uniques.

L'étude n'a pas mis en évidence de modification pharmacodynamique. Plusieurs limites de cette étude peuvent en être à l'origine. On peut évoquer le manque de puissance de l'étude. Les huit sujets inclus dans cette étude sont insuffisants compte tenu de la forte variabilité inter et intra-individuelle de l'acénocoumarol. La population jeune et le plan de prise unique du médicament s'éloignent du cadre usuel de la prescription. Pourtant ce type d'étude d'interaction médicamenteuse avec une dose unique d'anticoagulants oraux a été validée, et est fréquemment utilisée. Cependant l'absence d'interaction en dose unique ne signifie pas qu'il n'y a pas d'interaction en doses répétées [de Hoon 1997]. L'absence d'effet du traitement antibiotique au niveau pharmacodynamique peut également s'expliquer en partie par la dose d'acénocoumarol choisie pour cette étude. En observant les résultats de la mesure du TP, on remarque que dès la première période le résultat est proche de l'effet maximum. Il paraît donc difficile de mettre en évidence un effet plus important en présence de l'association antibiotique.

Notre étude prouve l'existence de l'interaction médicamenteuse entre acénocoumarol et amoxicilline plus acide clavulanique du point de vue pharmacocinétique et selon les critères retenus par les autorités réglementaires. La modélisation montre que la clairance est diminuée de l'ordre de 15% en présence de l'association antibiotique. Pourtant cette modification ne se confirme pas au niveau clinique. A ce jour, aucune modification des pratiques ne doit être

envisagée car il n'est pas pertinent, à l'issue de nos résultats, de proposer des précautions d'emploi pour l'association de l'acénocoumarol avec cette association antibiotique. Nous proposons de confirmer ces résultats par une autre étude avec une plus grande puissance. On peut proposer, sur la base de simulations qui reposeraient sur ce travail de modélisation, des schémas posologiques plus adaptés à la mise en évidence de l'interaction. Cette nouvelle étude pourrait comprendre des dosages d'énantiomères de l'acénocoumarol. Sa mesure pourrait mettre en évidence une grande variation de la cinétique sur cet isomère actif. Un génotypage de CYP 2C9 et de la vitamine K époxyde réductase (VKORC) serait intéressant puisque leurs polymorphismes génétiques sont des déterminants majeurs de la variabilité de la réponse aux AVK.

8 Étude de l'interaction médicamenteuse entre clopidogrel et la fluoxétine : Étude PLATINE

8.1 Introduction

8.1.1 Rappel pharmacologique sur la fluoxétine

La fluoxétine est un médicament psychotrope utilisé comme antidépresseur.

Pharmacocinétique

Absorption : Après une administration par voie orale, la fluoxétine est bien absorbée. La biodisponibilité est bonne et n'est pas modifiée par la prise alimentaire.

Distribution : La liaison de la fluoxétine aux protéines plasmatiques est élevée (environ 95 %). La fluoxétine est largement distribuée avec un volume de distribution de 20 à 40 L/kg. Les concentrations plasmatiques à l'équilibre sont obtenues après plusieurs semaines d'administration.

Métabolisme : La fluoxétine est principalement métabolisée au niveau hépatique essentiellement par CYP2D6 et donne lieu, par déméthylation, au métabolite actif la norfluoxétine.

Élimination : La demi-vie d'élimination de la fluoxétine est de 4 à 6 jours et celle de la norfluoxétine est de 4 à 16 jours. Ces longues demi-vies entraînent une persistance du produit dans l'organisme pendant 5 à 6 semaines après l'arrêt du traitement. L'élimination se fait principalement (environ 60 %) par voie rénale.

Pharmacodynamie

La fluoxétine facilite la transmission sérotoninergique cérébrale en inhibant de façon sélective la recapture de la sérotonine au niveau de la fente synaptique. La fluoxétine inhibe également, de façon moins importante, la recapture de la noradrénaline et de la dopamine.

8.1.2 Contexte

À ce jour, 4 % à 30 % des patients traités par clopidogrel sont considérés comme mauvais répondeurs, non répondeurs ou résistants à cette thérapeutique [Nguyen 2005]. La définition de cette résistance repose sur la mesure du critère biologique d'agrégométrie des plaquettes. La conséquence de cette inefficacité est une exposition plus importante au risque de développer des événements cardiovasculaires.

Plusieurs facteurs expliquant la résistance au clopidogrel ont été identifiés : la variabilité pharmacocinétique inter et intra individuelle de la molécule, le polymorphisme génétique des enzymes impliquées dans le métabolisme du clopidogrel, le polymorphisme génétique du récepteur plaquettaire du clopidogrel (P2Y₁₂), mais également les interactions médicamenteuses [Gurbel 2007]. Les interactions médicamenteuses impliquées dans cette résistance sont assez peu étudiées. La littérature ne mentionne que des interactions pharmacocinétiques avec le clopidogrel. C'est par exemple le cas dans l'inhibition du cytochrome P450 3A4 intervenant dans le métabolisme du clopidogrel par certaines statines [Lau 2003]. Cependant, il existe un certain nombre d'arguments en faveur d'une interaction médicamenteuse entre les antidépresseurs de la classe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et le clopidogrel. La fluoxétine pourrait interagir plus particulièrement avec le clopidogrel selon plusieurs mécanismes.

Sur le plan pharmacocinétique

Des interactions médicamenteuses pharmacocinétiques avec le clopidogrel ont été étudiées à plusieurs reprises. Elles concernaient de puissants inhibiteurs du cytochrome P450 3A4 : statines, érythromycine, kétoconazole, etc. [Lau and Gurbel 2006]. Le CYP 3A4 est l'un des systèmes oxydatifs responsable de la production du métabolite actif à l'origine du blocage de récepteur à l'ADP, P2Y₁₂ à l'origine de l'activité antiagrégante du clopidogrel. Cependant d'autres cytochromes interviennent dans la voie métabolique de production de la molécule active. Il s'agit des cytochromes CYP2B6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5. Ils constituent certainement d'autres cibles potentielles d'interaction médicamenteuse [Savi 2000; Clarke 2003]. En effet, des études ont démontré que le polymorphisme génétique de ces cytochromes entraînait des variations pharmacocinétiques importantes du clopidogrel. Trois études évaluant l'influence du polymorphisme génétique impliqué dans la perte de fonction métabolique du CYP2C19 et du CYP3A4 ont démontré

une diminution significative de la réponse au clopidogrel chez le volontaire sain [Hulot 2006; Fontana 2007].

On peut supposer que les conséquences d'une inhibition pharmacologique des cytochromes se traduiront par les mêmes modifications pharmacocinétiques observées dans le cas d'une mutation allélique entraînant la synthèse de cytochromes inactifs. La fluoxétine a démontré une action inhibitrice sur plusieurs familles de cytochromes et notamment sur le CYP2D6 et, de façon plus modérée, sur les CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 et CYP2C19 qui sont quatre cytochromes impliqués dans le métabolisme du clopidogrel [Spina 2003]. La fluoxétine pourrait donc diminuer la production de métabolite actif du clopidogrel. Cette hypothèse semble être soutenue par une étude prospective cas-témoin qui a étudié la variabilité de la réponse au clopidogrel dans un groupe comparé à des témoins. L'auteur décrit une exposition supérieure au risque d'être mauvais répondeur au clopidogrel en cas de prise d'ISRS (Odds ratio = 5.22) [Feher 2007].

Sur le plan pharmacodynamique

La fluoxétine potentialiserait l'effet antiagrégant du clopidogrel. Comme tous les ISRS, elle augmenterait le risque hémorragique. Il s'agit d'un effet indésirable très largement discuté dans la littérature. Le mécanisme probablement mis en jeu correspondrait à un blocage de la recapture de la sérotonine au niveau plaquettaire. La conséquence d'une telle modification est complexe, mais il existe un consensus sur une diminution de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires [Alvarez 1999; Serebruany 2001]. Les dernières revues de la littérature sur le thème soulignent le faible niveau de preuve de cet effet indésirable, car il repose essentiellement sur des registres, des études rétrospectives ou des études cas-témoins [Serebruany 2006]. Il existe cependant un certain nombre d'arguments en faveur d'un tel mécanisme. Hergovich a démontré, dans une étude randomisée versus placebo, une diminution de la concentration de 83 % de la concentration plaquettaire de la sérotonine des volontaires exposés à la paroxétine [Hergovich 2000]. Cette modification a entraîné une diminution de la formation du clou plaquettaire. Une autre étude in vitro a démontré que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire était proportionnelle à la puissance de recapture des ISRS [Meijer 2004]. La fluoxétine est classée avec la paroxétine parmi les recapteurs les plus puissants. Elle est donc la plus sujette à ce mécanisme, ce qui semble confirmé par l'étude de Meijer [Meijer 2004].

Au final, les différents mécanismes d'interactions pharmacocinétique et pharmacodynamie possibles auraient des conséquences cliniques opposées. Une étude chez le volontaire sain nous permettra de savoir si la fluoxétine module l'efficacité du clopidogrel, dans quel sens et avec quelle intensité. Les conséquences d'une telle interaction peuvent être importantes. Si la fluoxétine chez le volontaire sain diminue l'efficacité du clopidogrel, on peut supposer qu'il en sera de même chez les patients avec une majoration du risque d'événement vasculaire ischémique. Cela pourrait entraîner des précautions d'emploi à propos de cette association sachant qu'il existe des alternatives aux IRS et beaucoup moins au clopidogrel. Si la fluoxétine potentialise l'effet antiagrégant du clopidogrel, cette association sera à éviter chez des patients pour lesquels des complications hémorragiques sont à craindre.

La fluoxétine et le clopidogrel font partie des médicaments les plus prescrits dans le monde. Il n'est donc pas rare de retrouver cette association médicamenteuse. La conséquence d'une telle étude est importante en terme de sécurité puisqu'elle permettra d'apporter le niveau de preuve suffisant pour émettre des recommandations de co-prescription, voir une modification du RCP du clopidogrel et de la fluoxétine.

8.1.3 Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'interaction médicamenteuse entre le clopidogrel et la fluoxétine sur le plan pharmacocinétique et pharmacodynamique chez le volontaire sain. Seule une étude de phase I réalisée chez le volontaire sain avec un plan d'étude croisé permet de garantir un biais minimum et de valider cliniquement les hypothèses de la littérature.

Cette étude avait également pour objectif secondaire d'évaluer les corrélations entre la pharmacocinétique du métabolite actif du clopidogrel et les différents tests de la fonction plaquettaire qui sont eux-mêmes, une source de variabilité analytique importante.

8.2 Sujets et Méthodes

8.2.1 Apports des MNLEM dans cette étude

8.2.2 Sujets

L'étude PLATINE (PLAvix et fluoxÉTINE) a été menée chez 8 hommes volontaires sains caucasiens. Les sujets ont été inclus après vérification des critères d'inclusion et de non inclusion de l'étude et après avoir signé un consentement libre et éclairé. Le protocole de l'étude était en accord avec la déclaration d'Helsinki et a reçu l'accord du comité de protection des personnes Rhône Alpes Loire. Les critères d'inclusion étaient : sujets âgés de 18 à 35 ans avec un poids compris entre 60 et 85 kg, un examen clinique et biologique (numération formule sanguine, fibrinogène, TCA, transaminases) normal. Les critères de non inclusion étaient : participation à un autre protocole de recherche clinique dans les 3 mois précédant l'inclusion, hypersensibilité au clopidogrel et à la fluoxétine, antécédents psychiatriques ou dépressifs, antécédents de convulsion ou de maladie hémorragique ou insuffisant hépatique, les sujets fumeurs. Pendant toute la durée de l'étude, toute prise médicamenteuse ou de jus de pamplemousse était proscrite.

8.2.3 Plan de l'étude

Il s'agit d'une étude en ouvert, randomisée avec un plan croisé. La mesure des paramètres biologiques a été réalisée en aveugle des traitements. L'étude était constituée de deux périodes de 24 heures d'hospitalisation où les traitements étaient administrés. En fonction de la randomisation, les patients étaient attribués au bras A ou B de l'étude.

Un sujet inclus dans le bras A de l'étude débutait l'essai par la séquence clopidogrel.

- Séquence clopidogrel (le 1^{er} jour) : les volontaires étaient hospitalisés et recevaient 8 comprimés de 75 mg (600 mg) de clopidogrel avec 150 mL d'eau [Dieker 2005; Cuisset 2006; Montalescot 2006].
- Période de « wash-out » (du 2^e jour au 44^e jour)
La période de « wash-out » durait 6 semaines. Pendant cette durée, le sujet était soumis à la contrainte de ne prendre aucun traitement. Cette période de lavage importante correspondait au temps nécessaire pour éliminer complètement la fluoxétine et ses métabolites actifs ($7 \frac{1}{2}$ vie).
- Séquence clopidogrel + fluoxétine (du 45^e jour au 49^e jour)
Elle débutait le 45^e jour par la prise d'une dose de 20 mg de fluoxétine dans le service de médecine interne. Le 46^e, 47^e, 48^e jour, les volontaires recevaient une dose de fluoxétine [Bjornsson 2003]. Le 49^e jour, les volontaires sains étaient à nouveau hospitalisés le

matin et recevaient une 5e dose de 20 mg de fluoxétine avec 150 mL d'eau puis avec les 8 comprimés de 75 mg de clopidogrel.

Un sujet inclus dans le bras B de l'étude débutait l'essai par la séquence clopidogrel + fluoxétine (1^{er} au 5e jour) suivie de la période de « wash-out » (6e au 48e jour) et la séquence clopidogrel (49e jour). L'alimentation était standardisée et distribuée à des horaires fixes identiques à chaque séquence. Le petit déjeuner et un déjeuner sans matière grasse (pour ne pas perturber les tests de fonction plaquettaire) étaient servis.

8.2.4 Prélèvements sanguins

Pendant chaque période d'hospitalisation, 11 prélèvements sanguins veineux ont été recueillis. Les prélèvements servant à l'analyse pharmacocinétique ont été recueillis sur des tubes secs (Vacutainer, Beckton Dickinson, Angleterre). Les prélèvements servant à l'analyse pharmacodynamique ont été recueillis sur des tubes citratés. Les mesures de concentrations de métabolite actif du clopidogrel ont été réalisées à $t=0,5$; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10. Les tests d'agrégation plaquettaire ont été réalisés à $t=0$; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8. Les mesures de l'état de phosphorylation de VASP et de la P-sélectine ont été réalisés à $t=0$; 6 ; 24.

8.2.5 Méthodes d'analyse

8.2.5.1 Mesure des concentrations du métabolite actif du clopidogrel

Le clopidogrel est une prodrogue qui nécessite plusieurs biotransformations hépatiques pour être actif [Savi 2000]. Un certain nombre de méthodes ont décrit la quantification du clopidogrel (prodrogue) ou son principal métabolite inactif (dérivé carboxylique du clopidogrel) et ne présente pas de réel intérêt compte tenu de l'inactivité des molécules [Lagorce 1998; Pereillo 2002; Lainesse 2004; Ksycinska 2006; Nirogi 2006; Soury 2006; Robinson 2007; Shin 2007; Bahrami 2008; Mani 2008; Patel 2008]. Taubert a proposé une méthode partiellement décrite permettant une approximation du métabolite actif du clopidogrel [Taubert 2004]. Plus récemment Takahashi a présenté une méthode complète permettant la quantification du métabolite actif [Takahashi 2008]. La présence d'une fonction thiol dans le métabolite actif rend le composé instable. Takahashi a proposé une méthode de

stabilisation par le 2-bromo-3'-méthoxyacétophénone et démontré son intérêt dans la quantification du métabolite actif du clopidogrel (MAC).

Dans le cadre de cette étude nous avons développé, validé et publié une nouvelle méthode de quantification rapide et simple du MAC par chromatographie liquide ultra haute performance. Le plasma a été obtenu par centrifugation à 3000 G pendant 5 minutes. Les plasmas ont été stockés à -80 °C jusqu'à la réalisation de l'analyse. Après une simple déprotéinisation du plasma à l'acétonitrile en présence d'étalon interne (MAC_D4), le surnageant était injecté dans le système chromatographique. La séparation a été réalisée par chromatographie (UPLC, Waters) en phase inverse sur une colonne greffée de type BEH C8 100 mm × 1 mm × 1.7 mm (Waters). La détection a été réalisée par spectrométrie de masse en tandem (QuattroMicro, Waters, Saint-Quentin Fallavier, France). La méthode est linéaire pour des concentrations allant de 1 à 150 ng/mL. La précision de la méthode est inférieure à 17 % pour les faibles concentrations (1 ng/mL). La justesse varie de 1,7 à 7,5 % en fonction du niveau de concentration. La limite de quantification de la méthode est de 0,8 ng/mL. La durée totale de l'analyse est de 5 minutes en tenant compte de la durée de centrifugation.

8.2.5.2 Paramètres pharmacocinétiques

Différents paramètres pharmacocinétiques, non compartimentaux, ont été estimés à partir des cinétiques individuelles pour réaliser les corrélations PK/PD avec le logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Les paramètres étudiés étaient : calcul de l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations plasmatiques en fonction du temps (de zéro à l'infini) à partir de la méthode des trapèzes. La concentration maximum (C_{max}), le temps mis pour obtenir la C_{max} (T_{max}) ont été déterminés graphiquement. Les demi-vies d'élimination (T_{1/2}) ont été calculées à partir de l'équation $T_{1/2} = \ln(2)/K_{el}$, pour laquelle K_{el} a été estimé à partir du coefficient directeur de la pente terminale de la courbe des concentrations en fonction du temps.

8.2.5.3 Tests d'agrégation plaquettaire

Préparation échantillon : Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) :

- Centrifugation des tubes à 160 g pendant 10 min
- Décantation du PRP dans un tube polypropylène (env. 800 µl dans chaque tube)
- Deuxième centrifugation à 2500 g pendant 15 min

- Décantation du plasma pauvre en plaquette nécessaire à la calibration de l'agrégomètre (100 % agrégation)
- Conservation : aucun. Les prélèvements sont traités dans les 3 heures

Technique de mesure : mesure de l'agrégation des plaquettes entre elles par turbidimétrie. L'agrégation plaquettaire induite par l'ADP à la concentration finale de 5 et 20 $\mu\text{mol/l}$ est enregistrée pendant 10 min par le Thrombo-agrégomètre TA-4V (Soderel Medical, France).

Deux paramètres ont été utilisés pour quantifier la réponse aux deux doses d'ADP : le pourcentage maximal d'agrégation (PMA) et le pourcentage d'agrégation résiduel à 6 min (PRA)

- Les paramètres pharmacodynamiques de modification de l'agrégation plaquettaire étaient exprimés : $\Delta\text{PMA}_t = \text{PMA}_0 - \text{PMA}_t$ (où PMA_t est l'agrégation maximale au temps t et PMA_0 , l'agrégation maximale avant la prise de clopidogrel)
- ΔPRA au temps t : $\Delta\text{PRA}_t = \text{PRA}_0 - \text{PRA}_t$ (où PRA_t est l'agrégation résiduelle à 6 min, au temps t et PRA_0 , l'agrégation résiduelle à 6 min, avant la prise de Clopidogrel)
- L'inhibition de l'agrégation plaquettaire maximale (IAPmax) pour chaque échantillon post dose sera calculée par $\text{IAPmax} = ((\text{PMA}_0 - \text{PMA}_t) / \text{PMA}_0) \times 100 \%$

8.2.5.4 Analyse quantitative de la phosphorylation de VASP par cytométrie en flux

Les analyses ont été réalisées extemporanément à partir du sang total. La mesure réalisée correspond au dosage plaquettaire de la protéine VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) par cytométrie en flux. L'inhibition du récepteur P_2Y_{12} est évaluée par le profil de phosphorylation de VASP, une protéine associée au cytosquelette. La protéine VASP, sous forme phosphorylée, traduit l'état inhibé du récepteur P_2Y_{12} alors que sa forme non phosphorylée est liée à la disponibilité du récepteur (figure 9). La mesure de la fluorescence des plaquettes a été réalisée par un cytomètre de type FACs Vantage SE (Becton Dickinson).

Le paramètre mesuré était l'index de réactivité plaquettaire (PRI). Il a été calculé, à partir de l'intensité de fluorescence moyenne corrigée (IFMc) ou Geomean, mesurée avec le logiciel winMDI 2.9 selon la formule suivante :

- $\text{PRI} = [(\text{IFMcPGE1} - \text{IFMcPGE1} + \text{ADP}) / \text{IFMcPGE1}] \times 100 \%$

8.2.5.5 Analyse quantitative de la P-sélectine par cytométrie en flux

L'analyse quantitative de la P-sélectine a été réalisée à partir de plasma riche en plaquettes dont la procédure est décrite ci-dessus. Tous les prélèvements ont été traités dans les 24 heures. Dans la plaquette au repos, la P-sélectine est stockée dans les granules alpha. L'activation plaquettaire se traduit par l'externalisation de la P-sélectine en surface. La mesure effectuée correspond à l'intensité de fluorescence moyenne. Elle est utilisée comme index de l'expression de surface de la P-sélectine par un cytomètre de flux. Le paramètre mesuré correspond au pourcentage de plaquettes positives pour la P-sélectine après activation plaquettaire induite par l'ADP.

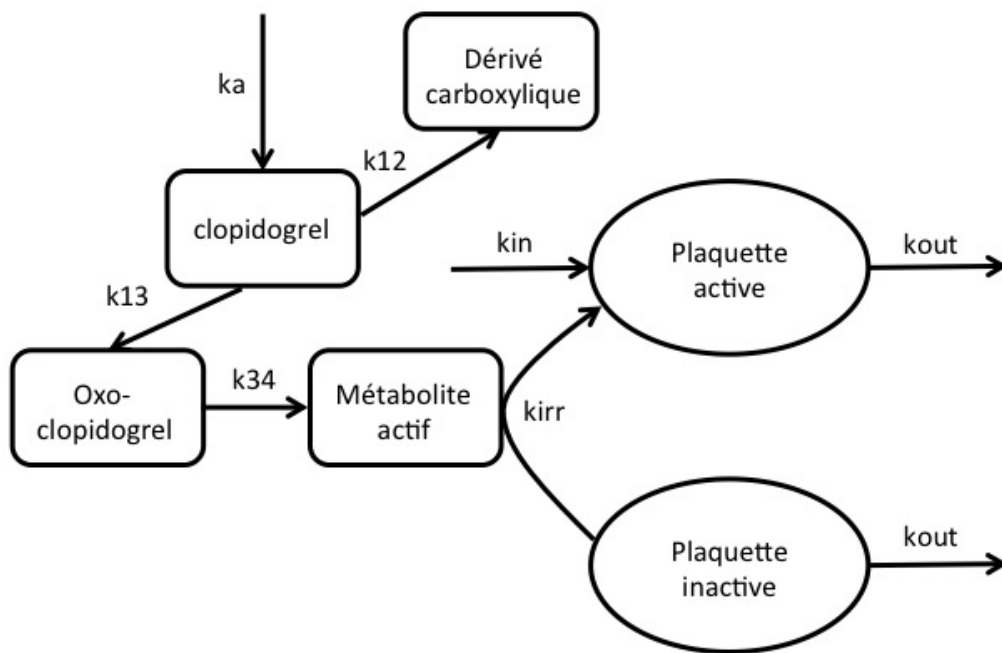
8.2.6 Analyse des résultats

8.2.6.1 Corrélations pharmacocinétiques et principaux tests de la fonction plaquettaire

Des corrélations linéaires ont été réalisées avec le logiciel R entre différents paramètres pharmacocinétiques du clopidogrel et les différents tests de la fonction plaquettaire réalisés au cours de cette étude. Les relations linéaires entre deux variables ont été déterminées par la moyenne des tests de Pearson. Les coefficients de détermination (R^2), les coefficients de corrélation (R) et leur significativité statistique ont aussi été calculés pour chaque relation.

8.2.6.2 Modélisation PK/PD

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la possibilité d'une interaction médicamenteuse entre le clopidogrel et la fluoxétine. L'analyse est en cours et elle repose sur le même principe que l'évaluation de l'interaction médicamenteuse entre l'acénocoumarol et l'amoxicilline plus acide clavulanique. Une structure du modèle PK/PD du clopidogrel a déjà été proposée par Ernest [Ernest 2008]. Nous proposons d'évaluer une version modifiée de ce modèle (figure 46).



$$\frac{dPq}{dt} = kin - Pl \times kout - Pl \times C_{CAM} \times kirr$$

Figure 46. Structure du modèle PK/PD du clopidogrel

Pq représente la quantité de plaquettes active ; C_{CAM} représente la concentration en métabolite actif ; *kin* et *kout* représente les constantes de synthèse et dégradation du pool de plaquette active. *Kirr*, représente la constante d'inhibition irréversible des plaquettes actives en plaquettes inactives (effet du clopidogrel). *k12*, *k23*, *k34* représentent les constantes de vitesse entre les différents compartiments pharmacocinétiques.

Pour évaluer l'effet de la fluoxétine, nous introduirons dans le modèle PK/PD, le traitement comme une covariable catégorielle sur les différents paramètres du modèle, selon la même procédure décrite précédemment. L'interaction médicamenteuse sera suspectée si l'ajout du traitement dans le modèle permet une meilleure prédiction du modèle et qu'elle modifie de façon significative un ou plusieurs paramètres cliniquement pertinents.

Par exemple, si on veut évaluer l'influence de la fluoxétine sur la clairance du clopidogrel, nous aurons les équations suivantes :

$$Cl = \theta_1 \times \exp \eta_1 \text{ sans traitement}$$

$$Cl = \theta_1 \times \theta_7 \times \exp \eta_1 \text{ avec traitement}$$

8.3 Résultats

8.3.1 Description de la population

Les caractéristiques démographiques et biologiques des 8 sujets volontaires sains sont présentées dans le tableau 22.

Tableau 22. Description de la population

Variables	Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Âge (années)	22.8	2.2	20	27
Poids (kg)	70.6	8.4	59	84
Taille (cm)	180.1	8.4	168	193
BMI (Kg/m ²)	21.7	2.1	19.8	25.4
BSA (m ²)	1.9	0.14	1.7	2.0
Numération PQ (G/L)	227	32.4	169	269

BMI (indice de masse corporelle) ; BSA (surface corporelle)

8.3.2 Description de la pharmacocinétique du métabolite actif

La méthode de quantification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a permis de décrire la pharmacocinétique du métabolite actif du clopidogrel après une absorption de 600 mg de clopidogrel. La figure 47 montre l'évolution de la moyenne des concentrations en fonction du temps.

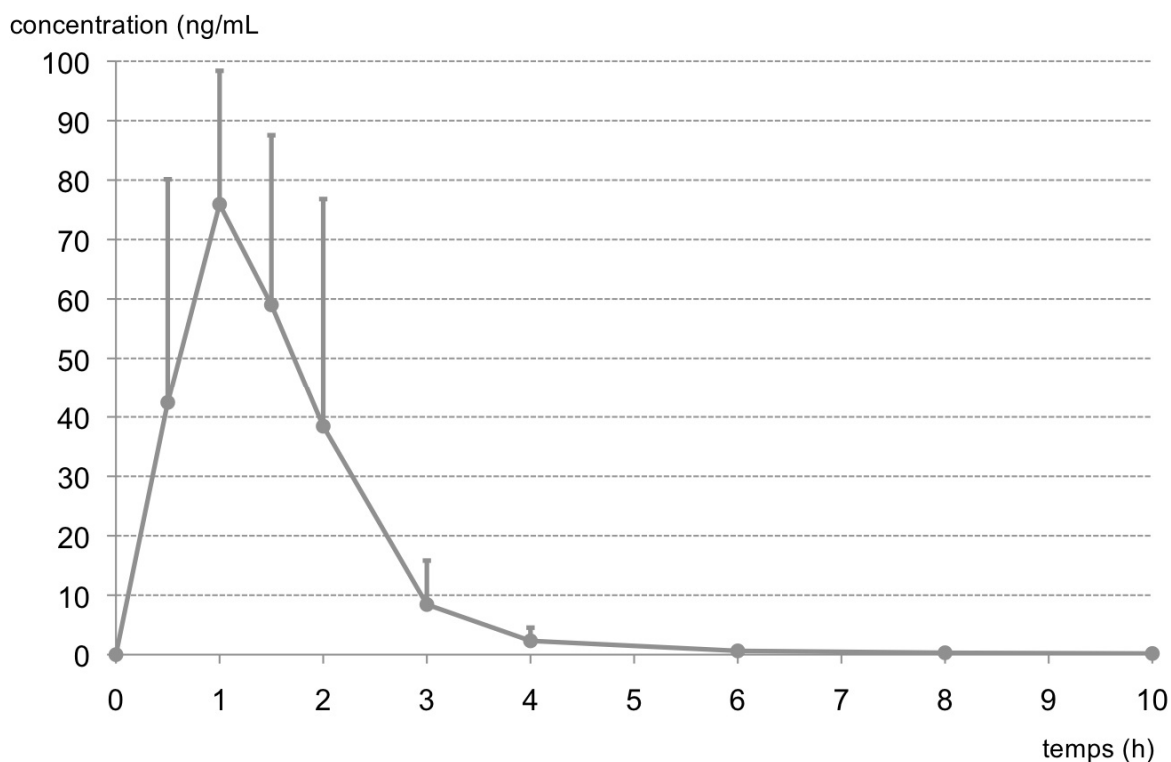


Figure 47. Évolution de la concentration du métabolite actif du clopidogrel en fonction du temps après absorption de 600 mg de clopidogrel

Les paramètres pharmacocinétique non compartimentaux du MAC sont : $AUC_{0-\infty}$ 131.5 ± 59.2 ng/ml*h; C_{max} 82.6 ± 30.9 ng/ml; T_{max} 1 h (median); $t_{1/2}$ 0.4 ± 0.1 h. Par comparaison avec les méthodes qui utilisent une stabilisation et une quantification du métabolite actif, nos résultats sont similaires. Dans l'étude de Brandt, la moyenne géométrique de l' $AUC_{0-\infty}$ était 43.8 ng/mL*h, celle de la C_{max} 35.9 ng/mL, après une administration de 300 mg de clopidogrel chez des volontaires sains [Brandt 2007]. Dans l'étude de Wallentin et al, la moyenne des $AUC_{0-\infty}$ était de 85.2 ng/mL*h après une administration de 600 mg clopidogrel chez des patients coronariens [Wallentin 2008].

8.3.3 Corrélations entre concentrations de métabolites actifs et tests de la fonction plaquettaire

Cette étude d'interaction médicamenteuse a servi de base à une étude de corrélation entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du clopidogrel (figure 48).

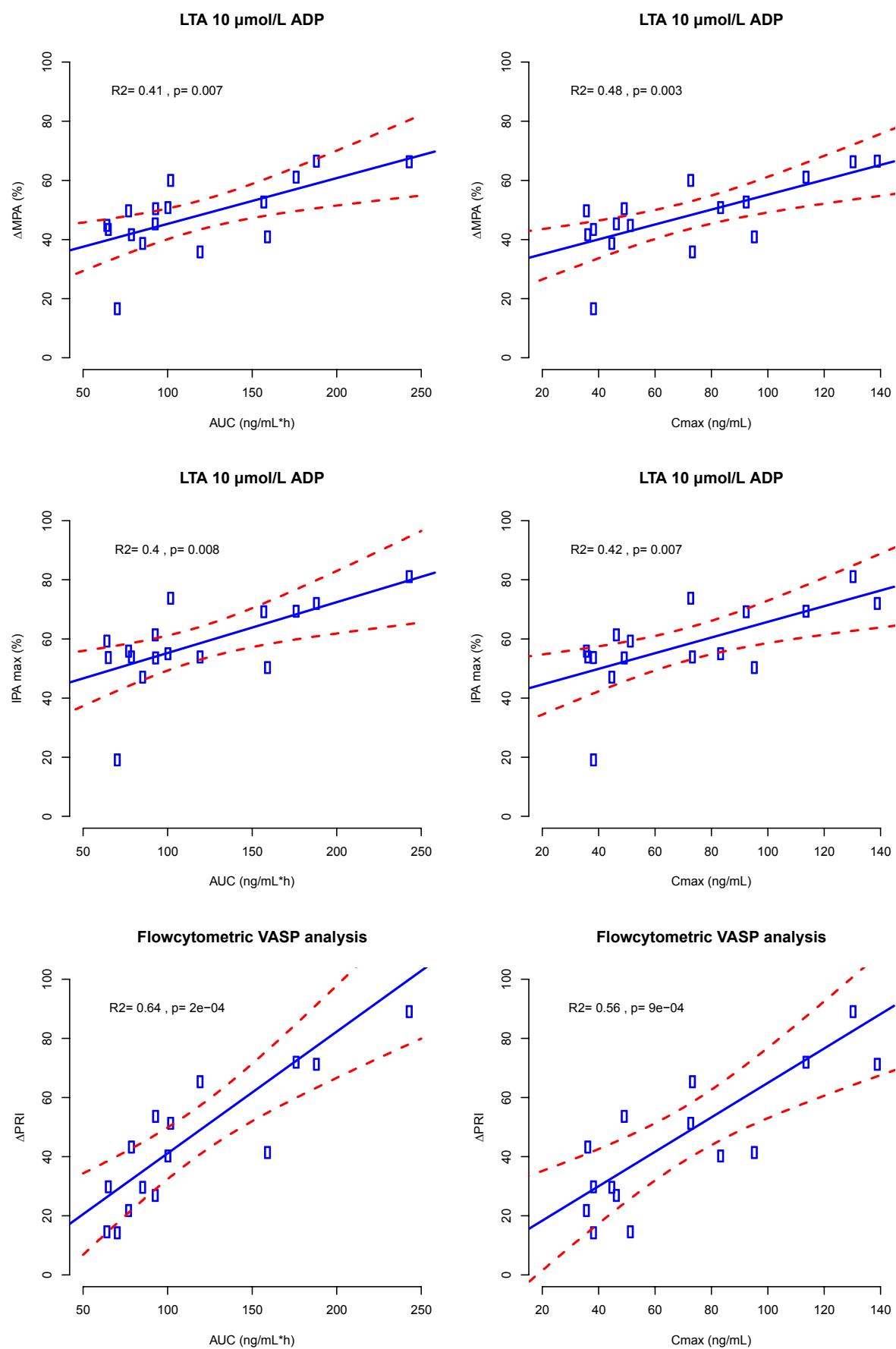


Figure 48. Corrélation entre les concentrations de MAC et les tests de la fonction plaquettaire

Les paramètres pharmacocinétiques du clopidogrel étaient extrêmement variables pour les 8 sujets sains recevant la même dose de 600 mg de clopidogrel. La concentration maximum du MAC variait de 37 à 131 ng/mL (médiane 79 ng/mL) et la valeur de l'AUC de 65 à 244 ng/mL.h (médiane 112 ng/mL.h). Les paramètres pharmacodynamiques fluctuaient également de façon importante. La mesure de l'état de phosphorylation de VASP, au moment où la concentration était au maximum, variait de 15 % à 86 % (médiane 53 %). L'inhibition maximum de l'agrégation plaquettaire en présence de 10 μ M d'ADP fluctuait de 51% à 74 % (médiane 61 %) et de 36 % à 67 % (médiane à 52 %) en présence de 5 μ M d'ADP. Cette étude a mis en évidence que la réponse pharmacodynamique du clopidogrel est bien en relation avec la concentration de son métabolite actif. La C_{max}, ainsi que l'AUC_{0-∞} de MAC, étaient significativement corrélés avec les tests de fonction plaquettaire (Figure 48). Les tests par cytométrie en flux de VASP étaient les mieux corrélés ($R = 0,79$ et $R = 0,84$; $p < 0,05$) que les tests d'agrégométrie par turbidimétrie ($R = 0,75$). Concernant les tests d'agrégation plaquettaire, les meilleures corrélations sont obtenues avec la concentration de 5 μ M d'ADP ($R = 0,76$ pour C_{max} et $R = 0,78$ pour AUC) par rapport à la concentration de 10 μ M d'ADP ($R = 0,77$ et $R = 0,7$ respectivement).

Cette étude conduite chez le volontaire sain confirme que le test VASP, qui évalue spécifiquement l'inhibition du récepteur P2Y₁₂, est un meilleur test que l'agrégométrie pour évaluer l'effet biologique du clopidogrel [Aleil 2009; Ben-Dor 2009]. Cette donnée n'est pas surprenante, car l'agrégométrie plaquettaire mesure également l'agrégation résultant du récepteur P2Y₁ qui n'est pas inhibé par le clopidogrel [Wallentin 2008; Bouman 2010]. La dose de clopidogrel peut affecter la valeur des tests évaluant la réponse de ce médicament : dans cette étude, les sujets étaient traités par une dose de charge (600 mg) ce qui permet une inhibition rapide et plus importante de l'agrégation plaquettaire par rapport à des doses inférieures qui sont associées à des réponses plus faibles [Gachet 2008].

8.4 Discussion

L'originalité de ce travail provient de la méthode de dosage et de ses conséquences sur la quantification du MAC et des corrélations qui en résultent avec les tests de fonction plaquettaire. Nous avons montré que l'inhibition plaquettaire est corrélée aussi bien avec la C_{max} qu'avec l'AUC. D'autres études ont déjà mis en évidence des corrélations, mais

uniquement avec la Cmax. Ceci est probablement dû à l'utilisation d'une méthode inappropriée de dosage du MAC. La corrélation avec les deux paramètres pharmacocinétiques s'explique mieux que la corrélation avec un seul des paramètres (Cmax) du fait du mécanisme d'inhibition irréversible du récepteur P2Y12 par le MAC [Simon 2009]. Dans notre étude, le MAC était quantifié par une méthode validée selon les standards internationaux et reposants sur une stabilisation du métabolite actif. L'étalonnage de la méthode a été réalisé avec le métabolite actif lui-même et non avec du clopidogrel comme cela a déjà été proposé [Taubert 2004; Bouman 2010]. D'autres part, Takahashi a démontré l'importance de la stabilisation du métabolite actif, puisqu'après 10 min seulement 20 % du métabolite actif est encore présent dans le plasma et évite ainsi des phénomènes de sous-estimations des concentrations réelles [Takahashi 2008].

Ces particularités analytiques expliquent probablement pourquoi, après la même administration d'une dose de 600 mg de clopidogrel, les concentrations de MAC varient de 40 à 140 ng/mL [Takahashi 2008; Delavenne, Basset, 2010] alors que dans une précédente étude de corrélation, les concentrations fluctuaient entre 5 et 35 mg/mL sans stabilisation du MAC [Taubert 2004; Bouman 2010].

En conclusion, l'utilisation d'une méthode validée selon les standards et utilisant une méthode de stabilisation du MAC, confirme les relations entre les concentrations de MAC et les tests de la fonction plaquettaire. La mesure de l'état de phosphorylation de VASP par cytométrie semble être le meilleur test biologique de mesure de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par le clopidogrel en pratique quotidienne. Compte tenu de la simplicité et la rapidité de notre méthode de dosage de MAC, sa quantification dans la pratique clinique peut être une bonne alternative aux méthodes complexes et coûteuses de mesure de la fonction plaquettaire.

DISCUSSION GENERALE

L'utilisation des modèles non linéaires à effets mixtes ne cesse de croître dans l'étude et le développement des médicaments. Ce travail a permis d'exposer différents domaines d'applications des MNLEM et les avantages qu'ils apportaient dans la recherche sur les médicaments antithrombotiques.

Leur intérêt principal est de permettre la réalisation des analyses à partir d'un petit nombre de prélèvements par patient. En effet, les MNLEM rendent possibles des études PK/PD à tous les stades du développement du médicament et en particulier lors des phases avancées III et IV. Ils constituent des outils de choix pour conduire des études post commercialisation (phase IV), dans la pratique clinique quotidienne. En limitant l'invasivité d'un trop grand nombre de prélèvements sanguins, ils facilitent l'inclusion des patients dans les expérimentations, sans modifier leur prise en charge. Le concept des deux premières études présentées dans ce travail (POP-A-RIX) repose sur cet atout des MNLEM.

Par ailleurs, les MNLEM permettent de mener des analyses dans des populations particulières. Dans l'étude PROPICE, les difficultés à recruter des patients insuffisants rénaux limitaient le nombre d'inclusions. Grâce aux outils de la D-optimalité et des connaissances recueillies dans l'étude POP-A-RIX, cette analyse a pu être réalisée.

De par leurs structures pharmaco-statistiques, les MNLEM présentent l'avantage de distinguer la variabilité inter et intra-individuelle. Une partie de la variabilité interindividuelle peut être expliquée par des covariables. Dans ce travail, il a en effet été possible d'établir des relations entre des covariables de différentes natures et des paramètres pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques des médicaments. L'influence des caractéristiques démographiques des patients (âge, poids), des facteurs environnementaux (tabagisme), de l'état physiopathologique des patients (insuffisants rénaux), de leur patrimoine génétique (CYP1A2, CYP2C9, VKORC1) a ainsi pu être mise en évidence à travers les différentes études présentées dans ce travail. De plus, les MNLEM permettent d'évaluer l'effet d'un traitement concomitant dans le cadre d'interactions médicamenteuses. Les MNLEM montrent là leur intérêt par rapport aux approches classiques.

A l'aide des MNLEM, on peut aussi apprécier l'impact d'une adaptation de posologies dans des populations à risque d'accumulation ou par exemple pour un génotype particulier. Des simulations peuvent être élaborées pour juger et valider des plans d'études.

Dans le cas où la variabilité inexpliquée d'un médicament est importante, il peut être utile de réaliser un suivi thérapeutique pharmacologique. Les MNLEM apportent une solution intéressante à cette approche, car ils permettent une estimation des paramètres PK/PD individuels sur la base d'un estimateur bayésien. À partir des paramètres pharmacologiques individuels, il devient ensuite très simple de calculer les profils de concentration ou d'effet pour un individu donné et de proposer des adaptations de traitement sur la base de simulations.

Nous avons vu dans ce travail que les avantages des MNLEM sont nombreux. Cependant il existe un certain nombre de limites dans l'utilisation de ces modèles.

L'écueil majeur de l'utilisation de ce type d'approche correspond à un risque d'échecs dans l'analyse des données éparées, en particulier si le plan de l'étude et le recueil des prélèvements ne sont pas appropriés. Si l'étape de modélisation n'aboutit pas, les données éparées deviennent inutilisables. Pour ces raisons, le plan de l'étude et le recueil des données représentent des aspects très importants. Le recueil des données comme la posologie, l'heure précise de l'administration des traitements et des prélèvements, la compliance aux traitements devient essentiel. Cette tâche peut être rendue difficile par le caractère aléatoire et peu fréquent des prélèvements, et ce plus particulièrement dans les études multicentriques incluant de nombreux patients. Aussi le plan de l'étude (nombre de prélèvements, temps de prélèvement, nombre de patients) doit être absolument étudié pour obtenir une précision suffisante des paramètres à estimer. Il est parfois nécessaire de recourir à un plan de prélèvements optimisé au préalable selon le critère de D-optimalité, surtout quand le nombre de patients inclus est limité.

De plus, les MNLEM sont développés pour une population de patients auxquels les médicaments sont destinés. Il est essentiel que cette population soit aussi hétérogène que possible pour être représentative. Comme nous l'avons démontré avec les études POP-A-RIX et PROPICE, il est indispensable de prendre des précautions par rapport aux interprétations que l'on peut faire à partir des modèles développés avec des patients trop sélectionnés.

Enfin la complexité des concepts pharmaco-statistiques et de l'estimation des paramètres nécessite une réelle connaissance et compréhension des processus pharmacologiques et statistiques pour obtenir des modèles cohérents. Par ailleurs, la partie structurelle (pharmacologique) de certains modèles PK/PD est parfois complexe, ce qui peut entraîner des durées d'analyse de plusieurs heures. De plus, l'offre logicielle et de formation

est faible. Aussi ces outils ne sont à ce jour pas encore accessibles à tous, même si les formations spécialisées et des livres pédagogiques commencent à apparaître [Simon 2006].

Les approches de population ont permis des avancées majeures dans la connaissance et la compréhension des sources de variabilité des médicaments antithrombotiques et de leur adaptation. Récemment, de nouvelles molécules antithrombotiques ont été développées et mises sur le marché. Leurs variabilités pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont considérablement réduites et ces molécules ne nécessitent a priori pas de surveillance biologique. Cependant, l'utilisation des MNLEM reste d'actualité pour ces traitements. En effet, ils seront toujours utilisés dans des populations extrêmes (faible poids, insuffisants rénaux, hépatique, etc.). Des mécanismes d'interactions médicamenteuses ont déjà été proposés et devront être évalués à l'avenir. Enfin, la plupart des plans de développement des médicaments présentent la limite de la sélection des patients inclus dans les études, pas toujours représentatifs de la population cible. Nous ne sommes ainsi pas à l'abri d'une variabilité ultérieure observée supérieure à celle attendue. Des études de populations devront alors être réalisées dans la pratique clinique courante pour confirmer ces résultats.

Références

- 1 **Affsaps (1998).** Médicaments antivitamine K (AVK) et prévention de la iatrogénie médicamenteuse.
- 2 **Affsaps (2008).** Schéma commun des Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) des spécialités AVK.
- 3 **G. P. Aithal, C. P. Day, P. J. Kesteven and A. K. Daly (1999).** Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 353(9154): 717-719.
- 4 **B. Aleil, C. Léon, J. P. Cazenave and C. Gachet (2009).** CYP2C19*2 polymorphism is not the sole determinant of the response to clopidogrel: implications for its monitoring. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 7(10): 1747-1749.
- 5 **J. C. Alvarez, N. Gluck, I. Arnulf, P. Quintin, M. Leboyer, R. Pecquery, J. M. Launay, F. Perez-Diaz and O. Spreux-Varoquaux (1999).** Decreased platelet serotonin transporter sites and increased platelet inositol triphosphate levels in patients with unipolar depression: effects of clomipramine and fluoxetine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 66(6): 617-624.
- 6 **J. Ansell, J. Hirsh, L. Poller, H. Bussey, A. Jacobson and E. Hylek (2004).** The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126(3 Suppl): 204S-233S.
- 7 **J. H. Arnsten, J. M. Gelfand and D. E. Singer (1997).** Determinants of compliance with anticoagulation: A case-control study. *The American Journal of Medicine* 103(1): 11-17.
- 8 **G. Aymard, M. Legrand, E. Comets, F. Mentré and B. Diquet (1998).** Rapid and simple micromethod for the quantification of fluindione in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 707(1-2): 169-173.
- 9 **G. Bahrami, B. Mohammadi and S. Sisakhtnezhad (2008).** High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: Application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 864(1-2): 168-172.
- 10 **T. Bandrowsky, A. A. Vorono, T. J. Borris and H. W. Marcantoni (1996).** Amoxicillin-related postextraction bleeding in an anticoagulated patient with tranexamic acid rinses. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 82(6): 610-612.

- 11 **L. Bara, A. Planes and M. M. Samama (1999).** Occurrence of thrombosis and haemorrhage, relationship with anti-Xa, anti-IIa activities, and D-dimer plasma levels in patients receiving a low molecular weight heparin, enoxaparin or tinzaparin, to prevent deep vein thrombosis after hip surgery. *British Journal of Haematology* 104(2): 230-240.
- 12 **K. A. Bauer, B. I. Eriksson, M. R. Lassen and A. G. Turpie (2001).** Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after elective major knee surgery. *The New England Journal of Medicine* 345(18): 1305-1310.
- 13 **L. A. Bauer, J. R. Horn and H. Pettit (1996).** Mixed-effect modeling for detection and evaluation of drug interactions: digoxin-quinidine and digoxin-verapamil combinations. *Therapeutic Drug Monitoring* 18(1): 46-52.
- 14 **C. Bazzoli, S. Retout and F. Mentre (2010).** Design evaluation and optimisation in multiple response nonlinear mixed effect models: PFIM 3.0. *Computer methods and programs in biomedicine* 98(1): 55-65.
- 15 **S. L. Beal and L. B. Sheiner (1982).** Estimating population kinetics. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 8(3): 195-222.
- 16 **L. Becquemont (2008).** Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. *European Journal of Clinical Pharmacology* 64(10): 953-960.
- 17 **M. Beinema, J. R. Brouwers, T. Schalekamp and B. Wilffert (2008).** Pharmacogenetic differences between warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Thrombosis and Haemostasis* 100(6): 1052-1057.
- 18 **I. Ben-Dor, N. S. Kleiman and E. Lev (2009).** Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy. *The American Journal of Cardiology* 104(2): 227-233.
- 19 **B. Benito, M. Masotti and A. Betriu (2005).** [Advances in adjunctive pharmacological therapy for percutaneous coronary interventions]. *Revista espanola de cardiologia* 58(6): 729-743.
- 20 **A. Berges, S. Laporte, M. Epinat, P. Zufferey, E. Alamartine, B. Tranchand, H. Decousus and P. Mismetti (2007).** Anti-factor Xa activity of enoxaparin administered at prophylactic dosage to patients over 75 years old. *British Journal of Clinical Pharmacology* 64(4): 428-438.
- 21 **T. D. Bjornsson, J. T. Callaghan, H. J. Einolf, V. Fischer, L. Gan, S. Grimm, J. Kao, S. P. King, G. Miwa, L. Ni, G. Kumar, J. McLeod, R. S. Obach, S. Roberts, A. Roe, A. Shah, F. Snikeris, J. T. Sullivan, D. Tweedie, J. M. Vega, J. Walsh and S. A. Wrighton (2003).** The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 31(7): 815-832.

- 22 **L. Bodin, C. Verstuyft, D.-A. Tregouet, A. Robert, L. Dubert, C. Funck-Brentano, P. Jaillon, P. Beaune, P. Laurent-Puig, L. Becquemont and M.-A. Lorient (2005).** Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 106(1): 135-140.
- 23 **A. J. Boeckmann, L. B. Sheiner and S. L. Beal (1994).** NONMEM Users Guide. *San Francisco, CA: NONMEM Project Group, University of California.*
- 24 **H. J. Bouman, E. Parlak, J. W. van Werkum, N. J. Breet, H. ten Cate, C. M. Hackeng, J. M. ten Berg and D. Taubert (2010).** Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 8(3): 482-488.
- 25 **M. Bourin, M. Lièvre and H. Allain (1993).** Cours de Pharmacocologie, Ellipse %7 3ème édition.
- 26 **J. T. Brandt, C. D. Payne, S. D. Wiviott, G. Weerakkody, N. A. Farid, D. S. Small, J. A. Jakubowski, H. Naganuma and K. J. Winters (2007).** A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *American Heart Journal* 153(1): 66.e69-16.
- 27 **K. Brendel, C. Dartois, E. Comets, A. Lemenuel-Diot, C. Laveille, B. Tranchand, P. Girard, C. M. Laffont and F. Mentré (2007).** Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clinical Pharmacokinetics* 46(3): 221-234.
- 28 **C. R. Brown, P. Jacob, M. Wilson and N. L. Benowitz (1988).** Changes in rate and pattern of caffeine metabolism after cigarette abstinence. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 43(5): 488-491.
- 29 **C. Cauli, L. Fenu, A. Perra and F. Marongiu (2004).** [Amoxicillin-clavulanic acid and oral anticoagulants: a possible dangerous association]. *Annali Italiani Di Medicina Interna: Organo Ufficiale Della Società Italiana Di Medicina Interna* 19(4): 276-279.
- 30 **T. A. Clarke and L. A. Waskell (2003).** The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 31(1): 53-59.
- 31 **D. W. Cockcroft and M. H. Gault (1976).** Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16(1): 31-41.
- 32 **C. Combescure, P. Fontana, N. Mallouk, P. Berdague, C. Labruyere, I. Barazer, J. C. Gris, S. Laporte, P. Fabbro-Peray and J. L. Reny (2010).** Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8(5): 923-933.
- 33 **T. Cuisset, C. Frere, J. Quilici, P. E. Morange, L. Nait-Saidi, J. Carvajal, A. Lehmann, M. Lambert, J. L. Bonnet and M. C. Alessi (2006).** Benefit of a 600-mg

- loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *Journal of the American College of Cardiology* 48(7): 1339-1345.
- 34 **G. D'Andrea, R. L. D'Ambrosio, P. Di Perna, M. Chetta, R. Santacroce, V. Brancaccio, E. Grandone and M. Margaglione (2005).** A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105(2): 645-649.
 - 35 **A. K. Daly and B. P. King (2003).** Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics* 13(5): 247-252.
 - 36 **L. Davydov, M. Yermolnik and L. J. Cuni (2003).** Warfarin and amoxicillin/clavulanate drug interaction. *The Annals of Pharmacotherapy* 37(3): 367-370
 - 37 **N. L. Dayneka, V. Garg and W. J. Jusko (1993).** Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 21(4): 457-478.
 - 38 **J. N. de Hoon, H. H. Thijssen, A. J. Beysens and L. M. Van Bortel (1997).** No effect of short-term omeprazole intake on acenocoumarol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *British Journal of Clinical Pharmacology* 44(4): 399-401.
 - 39 **X. Delavenne, T. Basset, P. Zufferey, N. Malouk, S. Laporte and P. Mismetti (2010).** Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel active metabolite. *Journal of Separation Science* 33(13): 1968-1972.
 - 40 **X. Delavenne, S. Laporte, S. Demasles, N. Mallouk, T. Basset, M. Tod, P. Girard and P. Mismetti (2009).** Investigation of PK-PD drug-drug interaction between acenocoumarol and amoxicillin plus clavulanic acid. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 23(1): 127-135.
 - 41 **X. Delavenne, P. Zufferey, D. Baylot, P. Nguyen, J. Y. Borg, M. Fontenay, B. Deygas, P. Mismetti and S. Laporte (2010).** Population pharmacokinetics of fondaparinux administered at prophylactic doses after major orthopaedic surgery in everyday practice. *Thrombosis and Haemostasis* 104(2): 252-260.
 - 42 **H. J. Dieker, M. A. Brouwer and F. W. Verheugt (2005).** ESC guidelines for percutaneous coronary interventions. *European Heart Journal* 26(22): 2475; author reply 2476-2477.
 - 43 **F. Donat, J. P. Duret, A. Santoni, R. Cariou, J. Necciari, H. Magnani and R. de Greef (2002).** The pharmacokinetics of fondaparinux sodium in healthy volunteers. *Clinical Pharmacokinetics* 41 Suppl 2: 1-9
 - 44 **M. H. Eckman, H. J. Levine and S. G. Pauker (1993).** Effect of laboratory variation in the prothrombin-time ratio on the results of oral anticoagulant therapy. *The New England Journal of Medicine* 329(10): 696-702.
 - 45 **EMA (2000).** Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence.

- 46 **B. I. Eriksson, K. A. Bauer, M. R. Lassen and A. G. Turpie (2001).** Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after hip-fracture surgery. *The New England Journal of Medicine* 345(18): 1298-1304.
- 47 **C. S. Ernest, 2nd, D. S. Small, S. Rohatagi, D. E. Salazar, L. Wallentin, K. J. Winters and R. E. Wrishko (2008).** Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 35(6): 593-618.
- 48 **FDA (1997).** Drug metabolism/drug interaction study in the drug development process: study invitro.
- 49 **FDA (1999).** Guidances for Industry: in vivo drug metabolism/drug interaction studies – study design, data analysis and recommendations for dosing and labeling.
- 50 **G. Feher, K. Koltai, B. Alkonyi, E. Papp, Z. Keszthelyi, G. Kesmarky and K. Toth (2007).** Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications. *International journal of cardiology* 120(2): 188-192.
- 51 **I. Fehrman-Ekholm and L. Skeppholm (2004).** Renal function in the elderly (>70 years old) measured by means of iohexol clearance, serum creatinine, serum urea and estimated clearance. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 38(1): 73-77.
- 52 **P. Fontana, A. Dupont, S. Gandrille, C. Bachelot-Loza, J. L. Reny, M. Aiach and P. Gaussem (2003).** Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 108(8): 989-995.
- 53 **P. Fontana, J. S. Hulot, P. De Moerloose and P. Gaussem (2007).** Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5(10): 2153-2155.
- 54 **C. Gachet (2008).** P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thrombosis and Haemostasis* 99(3): 466-472.
- 55 **W. H. Geerts, D. Bergqvist, G. F. Pineo, J. A. Heit, C. M. Samama, M. R. Lassen and C. W. Colwell (2008).** Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 133(6 Suppl): 381S-453S.
- 56 **C. Geisen, M. Watzka, K. Sittinger, M. Steffens, L. Daugela, E. Seifried, C. R. Müller, T. F. Wienker and J. Oldenburg (2005).** VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thrombosis and Haemostasis* 94(4): 773-779.
- 57 **T. S. Gill, K. J. Hopkins and M. Rowland (1988).** Stereospecific assay of nicoumalone: application to pharmacokinetic studies in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 25(5): 591-598.
- 58 **P. A. Gurbel and U. S. Tantry (2007).** Clopidogrel resistance? *Thrombosis research* 120(3): 311-321.

- 59 **W. D. Hall (1999)**. Abnormalities of kidney function as a cause and a consequence of cardiovascular disease. *The American journal of the medical sciences* 317(3): 176-182.
- 60 **N. Hergovich, M. Aigner, H. G. Eichler, J. Entlicher, C. Drucker and B. Jilma (2000)**. Paroxetine decreases platelet serotonin storage and platelet function in human beings. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 68(4): 435-442.
- 61 **M. K. Higashi, D. L. Veenstra, L. M. Kondo, A. K. Wittkowsky, S. L. Srinouanprachanh, F. M. Farin and A. E. Rettie (2002)**. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 287(13): 1690-1698.
- 62 **N. Holford (2005)** The visual predictive check superiority to standard diagnostic (Rorschach) plot. PAGE <http://www.page-meeting.org/?abstract=738>.
- 63 **Y. Horsmans, D. Larrey, D. Pessayre and J. P. Benhamou (1990)**. [Hepatotoxicity of antimicrobial agents. I: Antibacterial antibiotics]. *Gastroent rologie Clinique Et Biologique* 14(12): 911-918.
- 64 **J. S. Hulot, A. Bura, E. Villard, M. Azizi, V. Remones, C. Goyenvall , M. Aiach, P. Lechat and P. Gaussem (2006)**. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 108(7): 2244-2247.
- 65 **T. S. Jennings, A. N. Nafziger, L. Davidson and J. S. Bertino (1993)**. Gender differences in hepatic induction and inhibition of theophylline pharmacokinetics and metabolism. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 122(2): 208-216.
- 66 **W. J. Jusko and H. C. Ko (1994)**. Physiologic indirect response models characterize diverse types of pharmacodynamic effects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 56(4): 406-419.
- 67 **K. G. Kowalski and M. M. Hutmacher (2001)**. Efficient screening of covariates in population models using Wald's approximation to the likelihood ratio test. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 28(3): 253-275.
- 68 **H. Ksycinska, P. Rudzki and M. Bukowska-Kiliszek (2006)**. Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(2): 533-539.
- 69 **E. Kuhn and M. Lavielle (2005)**. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Stat Anal* 49: 1020-1030.
- 70 **P. Lagorce, Y. Perez, J. Ortiz, J. Necciari and F. Bressolle (1998)**. Assay method for the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 720(1-2): 107-117.
- 71 **A. Lainesse, Y. Ozalp, H. Wong and R. S. Alpan (2004)**. Bioequivalence study of clopidogrel bisulfate film-coated tablets. *Arzneimittel-Forschung* 54(9A): 600-604.

- 72 **C. S. Landefeld and P. A. Anderson (1992).** Guideline-based consultation to prevent anticoagulant-related bleeding. A randomized, controlled trial in a teaching hospital. *Annals of Internal Medicine* 116(10): 829-837.
- 73 **S. Laporte-Simitsidis, P. Girard, P. Mismetti, S. Chabaud, H. Decousus and J. P. Boissel (2000).** Inter-study variability in population pharmacokinetic meta-analysis: when and how to estimate it? *Journal of pharmaceutical sciences* 89(2): 155-167.
- 74 **C. Larramendy-Gozalo, J. Q. Yang, C. Verstuyft, L. Bodin, L. Dubert, Y. Zhang, C. Xu, L. Fan, P. Jaillon and L. Becquemont (2006).** Genetic polymorphism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) 1173C>T in a Chinese and a Caucasian population. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98(6): 611-613.
- 75 **M. R. Lassen, K. A. Bauer, B. I. Eriksson and A. G. Turpie (2002).** Postoperative fondaparinux versus preoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism in elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind comparison. *Lancet* 359(9319): 1715-1720.
- 76 **W. C. Lau and P. A. Gurbel (2006).** Antiplatelet drug resistance and drug-drug interactions: Role of cytochrome P450 3A4. *Pharmaceutical research* 23(12): 2691-2708.
- 77 **W. C. Lau, P. A. Gurbel, P. B. Watkins, C. J. Neer, A. S. Hopp, D. G. Carville, K. E. Guyer, A. R. Tait and E. R. Bates (2004).** Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 109(2): 166-171.
- 78 **W. C. Lau, L. A. Waskell, P. B. Watkins, C. J. Neer, K. Horowitz, A. S. Hopp, A. R. Tait, D. G. Carville, K. E. Guyer and E. R. Bates (2003).** Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 107(1): 32-37.
- 79 **S.-C. Lee, S.-S. Ng, J. Oldenburg, P.-Y. Chong, S. Rost, J.-Y. Guo, H.-L. Yap, S. C. Rankin, H.-B. Khor, T.-C. Yeo, K.-S. Ng, R. Soong and B.-C. Goh (2006).** Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in an Asian population. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 79(3): 197-205.
- 80 **A. S. Levey, J. P. Bosch, J. B. Lewis, T. Greene, N. Rogers and D. Roth (1999).** A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of Internal Medicine* 130(6): 461-470.
- 81 **T. Li, C.-Y. Chang, D.-Y. Jin, P.-J. Lin, A. Khvorova and D. W. Stafford (2004).** Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427(6974): 541-544.
- 82 **J. C. Lormeau and J. P. Herault (1995).** The effect of the synthetic pentasaccharide SR 90107/ORG 31540 on thrombin generation ex vivo is uniquely due to ATIII-mediated neutralization of factor Xa. *Thrombosis and Haemostasis* 74(6): 1474-1477.

- 83 **D. E. Mager, E. Wyska and W. J. Jusko (2003).** Diversity of mechanism-based pharmacodynamic models. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 31(5): 510-518.
- 84 **H. Mani, S. W. Toennes, B. Linnemann, D. A. Urbanek, J. Schwonberg, G. F. Kauert and E. Lindhoff-Last (2008).** Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy? *Therapeutic Drug Monitoring* 30(1): 84-89.
- 85 **W. E. Meijer, E. R. Heerdink, W. A. Nolen, R. M. Herings, H. G. Leufkens and A. C. Egberts (2004).** Association of risk of abnormal bleeding with degree of serotonin reuptake inhibition by antidepressants. *Archives of internal medicine* 164(21): 2367-2370.
- 86 **F. Mentré, F. Pousset, E. Comets, B. Plaud, B. Diquet, G. Montalescot, A. Ankri, A. Mallet and P. Lechat (1998).** Population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of fluindione in patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 63(1): 64-78.
- 87 **E. A. Millican, P. A. Lenzini, P. E. Milligan, L. Grosso, C. Eby, E. Deych, G. Grice, J. C. Clohisy, R. L. Barrack, R. S. J. Burnett, D. Voora, S. Gatchel, A. Tiemeier and B. F. Gage (2007).** Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 110(5): 1511-1515.
- 88 **C. Minto, B. Li, B. Tattam, K. Brown, J. P. Seale and R. Donnelly (2000).** Pharmacokinetics of epimeric budesonide and fluticasone propionate after repeat dose inhalation--intersubject variability in systemic absorption from the lung. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50(2): 116-124.
- 89 **P. Mismetti, S. Laporte, P. Girard and H. Decousus (1998)** Indirect Pharmacodynamic Model With Two Different Markers Of Oral Anticoagulant In Young Healthy Volunteers. <http://www.page-meeting.org/default.asp?abstract=283>.
- 90 **G. Montalescot, G. Sideris, C. Meuleman, C. Bal-dit-Sollier, N. Lellouche, P. G. Steg, M. Slama, O. Milleron, J. P. Collet, P. Henry, F. Beygui and L. Drouet (2006).** A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 48(5): 931-938.
- 91 **S. Morin, L. Bodin, M.-A. Lorient, H. H. W. Thijssen, A. Robert, S. Strabach, C. Verstuyft, D.-A. Tregouet, L. Dubert, P. Laurent-Puig, C. Funck-Brentano, P. Jaillon, P. H. Beaune and L. Becquemont (2004).** Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 75(5): 403-414.
- 92 **D. R. Mungall, T. M. Ludden, J. Marshall, D. W. Hawkins, R. L. Talbert and M. H. Crawford (1985).** Population pharmacokinetics of racemic warfarin in adult patients. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 13(3): 213-227.

- 93 **T. A. Nguyen, J. G. Diodati and C. Pharand (2005).** Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *Journal of the American College of Cardiology* 45(8): 1157-1164.
- 94 **R. V. S. Nirogi, V. N. Kandikere, M. Shukla, K. Mudigonda, S. Maurya and R. Boosi (2006).** Quantification of clopidogrel in human plasma by sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 20(11): 1695-1700.
- 95 **R. A. O'Reilly, P. M. Aggeler, M. S. Hoag, L. S. Leong and M. L. Kropatkin (1964).** Hereditary transmission of exceptional resistance to coumarin anticoagulant drugs. The first reported kindred. *The New England Journal of Medicine* 271: 809-815.
- 96 **R. A. O'Reilly and D. A. Rytand (1980).** "Resistance" to warfarin due to unrecognized vitamin K supplementation. *The New England Journal of Medicine* 303(3): 160-161.
- 97 **J. Oldenburg, E. M. Quenzel, U. Harbrecht, A. Fregin, W. Kress, C. R. Müller, H. J. Hertfelder, R. Schwaab, H. H. Brackmann and P. Hanfland (1997).** Missense mutations at ALA-10 in the factor IX propeptide: an insignificant variant in normal life but a decisive cause of bleeding during oral anticoagulant therapy. *British Journal of Haematology* 98(1): 240-244.
- 98 **X. Panhard and F. Mentré (2005).** Evaluation by simulation of tests based on non-linear mixed-effects models in pharmacokinetic interaction and bioequivalence cross-over trials. *Statistics in Medicine* 24(10): 1509-1524.
- 99 **N. K. Patel, G. Subbaiah, H. Shah, M. Kundlik and P. S. Shrivastav (2008).** Rapid LC-ESI-MS-MS method for the simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma. *Journal of Chromatographic Science* 46(10): 867-875.
- 100 **V. Pengo, C. Pegoraro, U. Cucchini and S. Ilceto (2006).** Worldwide management of oral anticoagulant therapy: the ISAM study. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 21(1): 73-77.
- 101 **F. J. Penning-van Beest, E. van Meegen, F. R. Rosendaal and B. H. Stricker (2001).** Drug interactions as a cause of overanticoagulation on phenprocoumon or acenocoumarol predominantly concern antibacterial drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69(6): 451-457.
- 102 **J.-M. Pereillo, M. Maftouh, A. Andrieu, M.-F. Uzabiaga, O. Fedeli, P. Savi, M. Pascal, J.-M. Herbert, J.-P. Maffrand and C. Picard (2002).** Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 30(11): 1288-1295.
- 103 **M. Petitou, J. C. Lormeau and J. Choay (1991).** Chemical synthesis of glycosaminoglycans: new approaches to antithrombotic drugs. *Nature* 350(6319 Suppl): 30-33.

- 104 **M. Petitou and C. A. van Boeckel (2004).** A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angewandte Chemie* 43(24): 3118-3133.
- 105 **R. K. Richards (1943).** Influence of fever upon the action of 3,3'-methylene-bis-(4-hydroxycoumarin) (dicumarol). *Science (New York, N.Y.)* 97(2518): 313.
- 106 **M. J. Rieder, A. P. Reiner, B. F. Gage, D. A. Nickerson, C. S. Eby, H. L. McLeod, D. K. Blough, K. E. Thummel, D. L. Veenstra and A. E. Rettie (2005).** Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *The New England Journal of Medicine* 352(22): 2285-2293.
- 107 **A. Robinson, J. Hillis, C. Neal and A. C. Leary (2007).** The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 848(2): 344-354.
- 108 **N. Rosencher, C. Vielpeau, J. Emmerich, F. Fagnani and C. M. Samama (2005).** Venous thromboembolism and mortality after hip fracture surgery: the ESCORTE study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 3(9): 2006-2014.
- 109 **S. Rost, A. Fregin, V. Ivaskevicius, E. Conzelmann, K. Hörtnagel, H.-J. Pelz, K. Lappégard, E. Seifried, I. Scharrer, E. G. D. Tuddenham, C. R. Müller, T. M. Strom and J. Oldenburg (2004).** Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427(6974): 537-541.
- 110 **S. Russmann, C. Gohlke-Bärwolf, E. Jähnchen, D. Trenk and H. Roskamm (1997).** Age-dependent differences in the anticoagulant effect of phenprocoumon in patients after heart valve surgery. *European Journal of Clinical Pharmacology* 52(1): 31-35.
- 111 **C. M. Samama, P. Ravaud, F. Parent, J. Barré, P. Mertl and P. Mismetti (2007).** Epidemiology of venous thromboembolism after lower limb arthroplasty: the FOTO study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5(12): 2360-2367.
- 112 **P. Savi, J. M. Pereillo, M. F. Uzabiaga, J. Combalbert, C. Picard, J. P. Maffrand, M. Pascal and J. M. Herbert (2000).** Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thrombosis and Haemostasis* 84(5): 891-896.
- 113 **T. Schalekamp, J. H. H. van Geest-Daalderop, H. de Vries-Goldschmeding, J. Conemans, M. j. Bernsen Mj and A. de Boer (2004).** Acenocoumarol stabilization is delayed in CYP2C93 carriers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 75(5): 394-402.
- 114 **U. I. Schwarz, M. D. Ritchie, Y. Bradford, C. Li, S. M. Dudek, A. Frye-Anderson, R. B. Kim, D. M. Roden and C. M. Stein (2008).** Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *The New England Journal of Medicine* 358(10): 999-1008.
- 115 **E. A. Sconce, T. I. Khan, H. A. Wynne, P. Avery, L. Monkhouse, B. P. King, P. Wood, P. Kesteven, A. K. Daly and F. Kamali (2005).** The impact of CYP2C9 and

- VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 106(7): 2329-2333.
- 116 **A. Segev, B. H. Strauss, M. Tan, C. Constance, A. Langer and S. G. Goodman (2005).** Predictors and 1-year outcome of major bleeding in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: insights from the Canadian Acute Coronary Syndrome Registries. *American Heart Journal* 150(4): 690-694.
 - 117 **V. L. Serebruany (2006).** Selective serotonin reuptake inhibitors and increased bleeding risk: are we missing something? *The American Journal of Medicine* 119(2): 113-116.
 - 118 **V. L. Serebruany, P. A. Gurbel and C. M. O'Connor (2001).** Platelet inhibition by sertraline and N-desmethylsertraline: a possible missing link between depression, coronary events, and mortality benefits of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 43(5): 453-462.
 - 119 **M. J. Shearer, H. Bechtold, K. Andrassy, J. Koderisch, P. T. McCarthy, D. Trenk, E. Jähnchen and E. Ritz (1988).** Mechanism of cephalosporin-induced hypoprothrombinemia: relation to cephalosporin side chain, vitamin K metabolism, and vitamin K status. *Journal of Clinical Pharmacology* 28(1): 88-95.
 - 120 **L. B. Sheiner and S. L. Beal (1981).** Some suggestions for measuring predictive performance. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 9(4): 503-512.
 - 121 **L. B. Sheiner and T. H. Grasela (1991).** An introduction to mixed effect modeling: Concepts, definitions, and justification. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 19(S3): 11S-24S.
 - 122 **L. B. Sheiner, B. Rosenberg and V. V. Marathe (1977).** Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 5(5): 445-479.
 - 123 **B. S. Shin and S. D. Yoo (2007).** Determination of clopidogrel in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography: BMC* 21(9): 883-889.
 - 124 **N. Simon (2006).** Pharmacocinétique de population : Introduction à Nonmem.
 - 125 **T. Simon, L. Becquemont, B. Hamon, E. Nouyrigat, Y. Chodjania, J. M. Poirier, C. Funck-Brentano and P. Jaillon (2001).** Variability of cytochrome P450 1A2 activity over time in young and elderly healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52(5): 601-604.
 - 126 **T. Simon, C. Verstuyft, M. Mary-Krause, L. Quteineh, E. Drouet, N. Méneveau, P. G. Steg, J. Ferrières, N. Danchin and L. Becquemont (2009).** Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *The New England Journal of Medicine* 360(4): 363-375.

- 127 **J. Soto, J. A. Sacristan, M. J. Alsar, C. Fernandez-Viadero and R. Verduga (1993).** Probable acenocoumarol-amoxycillin interaction. *Acta Haematologica* 90(4): 195-197.
- 128 **E. Souiri, H. Jalalizadeh, A. Kebriaee-Zadeh, M. Shekarchi and A. Dalvandi (2006).** Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography: BMC* 20(12): 1309-1314.
- 129 **E. Spina, M. G. Scordo and C. D'Arrigo (2003).** Metabolic drug interactions with new psychotropic agents. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17(5): 517-538.
- 130 **H. Takahashi and H. Echizen (2001).** Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* 40(8): 587-603.
- 131 **H. Takahashi, G. R. Wilkinson, E. A. Nutescu, T. Morita, M. D. Ritchie, M. G. Scordo, V. Pengo, M. Barban, R. Padriani, I. Ieiri, K. Otsubo, T. Kashima, S. Kimura, S. Kijima and H. Echizen (2006).** Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenetics and Genomics* 16(2): 101-110.
- 132 **M. Takahashi, H. Pang, K. Kawabata, N. A. Farid and A. Kurihara (2008).** Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(4): 1219-1224.
- 133 **D. Taubert, A. Kastrati, S. Harlfinger, O. Gorchakova, A. Lazar, N. von Beckerath, A. Schömig and E. Schömig (2004).** Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thrombosis and Haemostasis* 92(2): 311-316.
- 134 **H. H. Thijssen, M. J. Drittij, L. M. Vervoort and J. C. de Vries-Hanje (2001).** Altered pharmacokinetics of R- and S-acenocoumarol in a subject heterozygous for CYP2C9*3. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 70(3): 292-298.
- 135 **H. H. Thijssen, J. P. Flinois and P. H. Beaune (2000).** Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 28(11): 1284-1290.
- 136 **H. H. W. Thijssen and B. Ritzen (2003).** Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 74(1): 61-68.
- 137 **D. J. Tipper (1985).** Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics* 27(1): 1-35.
- 138 **G. T. Tucker, J. B. Houston and S. M. Huang (2001).** Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential--towards a consensus. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52(1): 107-117.

- 139 **A. Turpie, K. Bauer, B. Eriksson and M. Lassen (2003).** Efficacy and safety of fondaparinux in major orthopedic surgery according to the timing of its first administration. *Thrombosis and Haemostasis* 90(2): 364-366.
- 140 **A. G. Turpie, K. A. Bauer, B. I. Eriksson and M. R. Lassen (2002).** Fondaparinux vs enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism in major orthopedic surgery: a meta-analysis of 4 randomized double-blind studies. *Archives of internal medicine* 162(16): 1833-1840.
- 141 **A. G. Turpie, K. A. Bauer, B. I. Eriksson and M. R. Lassen (2002).** Postoperative fondaparinux versus postoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind trial. *Lancet* 359(9319): 1721-1726.
- 142 **A. G. Turpie, B. I. Eriksson, M. R. Lassen and K. A. Bauer (2002).** A meta-analysis of fondaparinux versus enoxaparin in the prevention of venous thromboembolism after major orthopaedic surgery. *Journal of the Southern Orthopaedic Association* 11(4): 182-188.
- 143 **A. G. Turpie, A. S. Gallus and J. A. Hoek (2001).** A synthetic pentasaccharide for the prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement. *The New England Journal of Medicine* 344(9): 619-625.
- 144 **A. G. G. Turpie, K. A. Bauer, B. I. Eriksson and M. R. Lassen (2002).** Postoperative fondaparinux versus postoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind trial. *Lancet* 359(9319): 1721-1726.
- 145 **A. G. G. Turpie, A. W. A. Lensing, T. Fuji and D. A. Boyle (2009).** Pharmacokinetic and clinical data supporting the use of fondaparinux 1.5 mg once daily in the prevention of venous thromboembolism in renally impaired patients. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 20(2): 114-121.
- 146 **J. A. Udall (1965).** Human sources and absorption of vitamin K in relation to anticoagulation stability. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 194(2): 127-129.
- 147 **M. Ufer (2010).** Comparative efficacy and safety of the novel oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban and apixaban in preclinical and clinical development. *Thrombosis and Haemostasis* 103(3): 572-585.
- 148 **Urcam (2001)** Consommation des antibiotiques systémiques dans le Nord Pas de Calais. <http://www.npdc.assurance-maladie.fr/fileadmin/NORD-PAS-DE-CALAIS/download/Cahiersmedic2.pdf>.
- 149 **C. Verstuyft, S. Morin, J. Yang, M. A. Lorient, V. Barbu, R. Kerb, U. Brinkmann, P. Beaune, P. Jaillon and L. Becquemont (2003).** [A new, rapid and robust genotyping method for CYP2C9 and MDR1]. *Annales De Biologie Clinique* 61(3): 305-309.

- 150 **C. Verstuyft, A. Robert, S. Morin, M. A. Lorient, A. Flahault, P. Beaune, C. Funck-Brentano, P. Jaillon and L. Becquemont (2003).** Genetic and environmental risk factors for oral anticoagulant overdose. *European Journal of Clinical Pharmacology* 58(11): 739-745.
- 151 **L. E. Visser, R. H. N. van Schaik, M. van Vliet, P. H. Trienekens, P. A. G. M. De Smet, A. G. Vulto, A. Hofman, C. M. van Duijn and B. H. C. Stricker (2004).** The risk of bleeding complications in patients with cytochrome P450 CYP2C9*2 or CYP2C9*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon. *Thrombosis and Haemostasis* 92(1): 61-66
- 152 **M. Wadelius, L. Y. Chen, K. Downes, J. Ghori, S. Hunt, N. Eriksson, O. Wallerman, H. Melhus, C. Wadelius, D. Bentley and P. Deloukas (2005).** Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *The Pharmacogenomics Journal* 5(4): 262-270.
- 153 **M. Wadelius, E. Darj, G. Frenne and A. Rane (1997).** Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 62(4): 400-407.
- 154 **U. Wählby, E. N. Jonsson and M. O. Karlsson (2001).** Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 28(3): 231-252.
- 155 **J. M. Walenga, L. Bara, M. Petitou, M. Samama, J. Fareed and J. Choay (1988).** The inhibition of the generation of thrombin and the antithrombotic effect of a pentasaccharide with sole anti-factor Xa activity. *Thrombosis research* 51(1): 23-33.
- 156 **L. Wallentin, C. Varenhorst, S. James, D. Erlinge, O. O. Braun, J. A. Jakubowski, A. Sugidachi, K. J. Winters and A. Siegbahn (2008).** Prasugrel achieves greater and faster P2Y₁₂receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *European Heart Journal* 29(1): 21-30.
- 157 **D. Warot, I. Berlin, G. Aymard, A. Ankri, C. Fabry, B. Besse, P. Lechat and B. Diquet (2000).** Beraprost sodium-fluindione combination in healthy subjects: pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 14(3): 231-236.
- 158 **R. H. White, R. J. Beyth, H. Zhou and P. S. Romano (1999).** Major bleeding after hospitalization for deep-venous thrombosis. *The American Journal of Medicine* 107(5): 414-424.
- 159 **G. D. Wood and T. Deeble (1993).** Warfarin: dangers with antibiotics. *Dental Update* 20(8): 350, 352-353.
- 160 **H.-Y. Yuan, J.-J. Chen, M. T. M. Lee, J.-C. Wung, Y.-F. Chen, M.-J. Charng, M.-J. Lu, C.-R. Hung, C.-Y. Wei, C.-H. Chen, J.-Y. Wu and Y.-T. Chen (2005).** A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Human Molecular Genetics* 14(13): 1745-1751.

- 161 **Z. Zhang, M. J. Fasco, Z. Huang, F. P. Guengerich and L. S. Kaminsky (1995).** Human cytochromes P4501A1 and P4501A2: R-warfarin metabolism as a probe. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 23(12): 1339-1346.
- 162 **H. Zhou (2006).** Population-based assessments of clinical drug-drug interactions: qualitative indices or quantitative measures? *Journal of Clinical Pharmacology* 46(11): 1268-1289.

Listes des tables et figures

Liste des figures

Figure 1. Relation entre les différents facteurs de l'hémostase et les cibles pharmacologiques.....	9
Figure 2. Structure chimique du fondaparinux.....	14
Figure 3. Mécanisme d'action du fondaparinux	14
Figure 4: Structures chimiques des AVK.....	16
Figure 5: Structure chimique de la vitamine K.....	17
Figure 6 : Mécanisme d'action des AVK.....	17
Figure 7. Corrélation INR - risque hémorragique et thrombotique.....	19
Figure 8. Structure chimique du clopidogrel.....	20
Figure 9. Mécanisme d'action du clopidogrel.....	21
Figure 10. Représentation du modèle a deux compartiments avec une absorption orale	31
Figure 11. Relation dose/concentration/effet d'un médicament.....	31
Figure 12. Description des activités anti-Xa du fondaparinux.....	45
Figure 13. Graphiques d'ajustement du modèle aux données	49
Figure 14. Visual Predictive Check.....	50
Figure 15. Validation externe.....	51
Figure 16. Prédiction de l'exposition après 7 jours de traitement par fondaparinux	54
Figure 17. Concentrations résiduelles individuelles prédites.	55
Figure 18. Simulations de l'exposition au fondaparinux pour 4 patients typiques	55
Figure 19. Simulations réalisées à partir du modèle pharmacocinétique du fondaparinux développé à partir des patients inclus dans les phases II/III.....	61
Figure 20. Description des prélèvements.....	67
Figure 21. Graphiques d'ajustement du modèle aux activités anti-Xa du fondaparinux	69
Figure 22. Exposition moyenne du fondaparinux des patients inclus dans PROPICE.....	70
Figure 23. Visual Predictive Check du modèle	70
Figure 24. Simulations d'exposition du fondaparinux pour différentes clairances de la créatinine	71
Figure 25. Comparaisons graphiques des performances des 3 modèles de population du fondaparinux sur les patients inclus dans l'étude PROPICE.....	73
Figure 26. Simulation et comparaison des expositions pour les patients de l'étude POP-A-RIX (2,5 mg/j) et les patients de l'étude PROPICE (1,5mg/j).....	75
Figure 27 : Représentation du phénomène d'hystérésis.....	85
Figure 28. Représentation du modèle de réponse indirecte.....	85
Figure 29. Relation entre le phénotype du CYP1A2 et le tabagisme des volontaires.....	89

Figure 30. Descriptions des données pharmacocinétiques (bleu) et pharmacodynamiques (rouge) de la fluindione.....	90
Figure 31. Paramètres PK (bleu), PD (rouge) d'ajustements graphiques du modèle.....	93
Figure 32. Visual Predictive Check PK (A) et PD (B).....	94
Figure 33. Descriptions des données PK (bleu) et PD (rouge) de l'acénocoumarol.....	96
Figure 34. Ajustements graphiques du modèle aux données PK (bleu) et PD (rouge).....	98
Figure 35. Visual Predictive Check PK/PD du S-acénocoumarol.....	99
Figure 36. Simulation des l'effet des covariables sur l'INR de la fluindione.....	102
Figure 37. Simulation de l'effet des covariables sur l'INR de l'acénocoumarol.....	103
Figure 38: Structures chimiques de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique.....	108
Figure 39. Données pharmacocinétique (concentration acénocoumarol) et pharmacodynamique (Taux de Prothrombine).....	118
Figure 40. Intervalle de confiance réglementaire (vert) et du rapport des AUC (violet).....	119
Figure 41. Représentations graphiques d'ajustement de modèle aux données PK.....	122
Figure 42. Graphiques d'ajustement du modèle final aux données PK.....	125
Figure 43. Visual Predictive Check de la PK de l'acénocoumarol.....	126
Figure 44. Graphiques d'ajustement du modèle aux données PD.....	128
Figure 45. Visual Predictive Check du modèle PD.....	130
Figure 46. Structure du modèle PK/PD du clopidogrel.....	143
Figure 47. Évolution de la concentration du métabolite actif du clopidogrel en fonction du temps après absorption de 600 mg de clopidogrel.....	145
Figure 48. Corrélation entre les concentrations de MAC et les tests de la fonction plaquettaire.....	146

Liste des tableaux

Tableau 1. Temps de demi-vie des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendant	18
Tableau 2. Paramètres pharmacocinétique du fondaparinux réalisés à partir des patients inclus dans les phases II/III.....	38
Tableau 3. Méthodes de dosages de l'activité anti-Xa du fondaparinux.....	40
Tableau 4. Caractéristiques démographiques et cliniques de la population.....	47
Tableau 5. Paramètres pharmacocinétiques du fondaparinux	48
Tableau 6. Caractéristiques démographiques par type de chirurgie des 442 patients analysés	65
Tableau 7. Paramètres pharmacocinétiques du fondaparinux	68
Tableau 8. Comparaison des biais et précisions des 3 modèles de populations décrits pour le fondaparinux et testés sur les patients de l'étude PROPICE.....	72
Tableau 9. Caractéristiques démographiques des sujets (variables continues)	88
Tableau 10. Caractéristiques génotypiques.....	88
Tableau 11. Paramètres PK/PD de la fluindione.....	91
Tableau 12. Paramètres du modèle PK/PD du S-acénocoumarol.....	97
Tableau 13. Résumé de l'effet des covariables sur l'INR prédit de la fluindione et du S-acénocoumarol à l'équilibre.	101
Tableau 14. Caractéristiques biologiques des sujets.	117
Tableau 15. AUC de l'acénocoumarol (mg/L.h) et du Tp (%.h)	118
Tableau 16. ANVOA de l'AUC de l'acénocoumarol.....	119
Tableau 17. Description des études utilisées dans le regroupement des données.....	120
Tableau 18. Modèles pharmacocinétique structurels étudiés.....	121
Tableau 19. Procédure d'intégration des covariables	124
Tableau 20. Construction du modèle structurel PD.....	127
Tableau 21. Procédure d'intégration des covariables dans le modèle PD	129
Tableau 22. Description de la population.....	144

Listes des publications

Publications écrites, internationales, indexées, avec comité de lecture

Delavenne X, Mallouk N, Piot M, Mismetti P, Laporte S. Is there really a relationship between the plasma concentration of the active metabolite of clopidogrel and the results of platelet function tests? J Thromb Haemost 2010; 8: 2334-8. (IF 6.069)

Delavenne X, Zufferey P, Baylot D, Nguyen P, Borg JY, Fontenay M, Deygas B, Mismetti P, Laporte S; GETHCAM Study Group; POP-A-RIX Investigators. Population pharmacokinetics of fondaparinux administered at prophylactic doses after major orthopaedic surgery in everyday practice. Thromb Haemost 2010; 104: 252-60. (IF 4.451)

Delavenne X, Basset T, Zufferey P, Malouk N, Laporte S, Mismetti P. Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel active metabolite. J Sep Sci 2010; 33: 1968-72. (IF 2.551)

Delavenne X, Laporte S, Demasles S, Mallouk N, Basset T, Tod M, Girard P, Mismetti P. Investigation of PK-PD drug-drug interaction between acenocoumarol and amoxicillin plus clavulanic acid. Fundam Clin Pharmacol 2009; 23: 127-35. (IF 2.372)

Communications orales sélectionnées sur résumé

Delavenne X, Zufferey P, Mismetti P, Laporte S for the PROPICE Study Group. Fondaparinux 1.5 mg in renally-impaired patients, Fondaparinux 2.5 mg in patients with normal renal function in the prevention of venous thromboembolism after major orthopedic surgery, the same exposure? Fundam Clin Pharmacol 2011

Mismetti P, Presle E, Delavenne X, Zufferey P, Barré J, Nguyen P, Borg JY, Laporte S. Biological and clinical predictors of bleeding in 999 patients treated with fondaparinux after major orthopaedic surgery: the POP-A-RIX study from the GEHCAM investigators. J Thromb Haemost 2009; 7(2) abstr. OC-MO-050 (Juillet 2009, XXII ISTH Congress Boston)

Delavenne X, Laporte S, Deygas B, Baylot D, Zufferey P, Barré J, Nguyen P, Borg JY, Charret F, Presles E, Mismetti P. Investigation of fondaparinux risk of major hemorrhage: the POP-A-RIX study. Prix jeune chercheur de la SFTP. Fundam Clin Pharmacol 2009; 23(S1) abstr. 523 (Juin 2009, Congrès P2T, Marseille)

Delavenne X, Laporte S, Deygas B, Baylot D, Zufferey P, Barré J, Nguyen P, Borg JY, Charret F, Mismetti P. Population pharmacokinetics of fondaparinux in orthopaedic surgery: the POP-A-RIX study. Fundam Clin Pharmacol 2008; 22 (S1) Abstracts 109 (Juin 2008, Congrès P2T, Clermont-Ferrand)

Delavenne X, Basset T, Moulin N, Gay-Montchamp JP, Decousus H, Mismetti P, Laporte S. An indirect PK-PD model to assess interaction between acenocoumarol and amoxicillin + clavulanic acid. Fundam Clin Pharmacol 2007; 21; 1-99 (Avril 2007, Congrès P2T, Toulouse)

Communications affichées sélectionnées sur résumé

Delavenne X, Laporte S, Deygas B, Baylot D, Zufferey P, Barré J, Nguyen P, Borg JY, Charret F, Mismetti P. Assessment of pharmacokinetic variability of fondaparinux in 809 patients treated after major orthopedic surgery: the POP-A-RIX study. PAGE 18 (2008) abstr. 1293 [www.page-meeting.org/?abstract=1293] (Juin 2008 : Congrès PAGE, Marseille)

Delavenne X, Basset T, Girard P, Decousus H, Mismetti P, Laporte S. The use of an indirect response model to assess interaction between drugs: acenocoumarol and amoxicillin + clavulanic acid. PAGE 16 (2007) Abstr. 1115 [www.page-meeting.org/?abstract=1115] (Juin 2007 : Congrès PAGE, Copenhagen)

Autres

Verstuyft C, Delavenne X, Rousseau A, Robert A, Tod M, Diquet B, Lebot M, Jaillon P, Becquemont L. A PK-PD Model for predicting the impact of CYP2C9, VKORC1 on Fluindione and acenocoumarol. Clin Pharmacokinet (2011), corrections demandées par reviewers

Analyse pharmacocinétique de l'étude PROPICE est en cours de rédaction.

ORIGINAL
ARTICLEInvestigation of PK–PD drug–drug
interaction between acenocoumarol and
amoxicillin plus clavulanic acidX. Delavenne^{a,b*}, S. Laporte^{a,b}, S. Demasles^c, N. Mallouk^{a,b}, T. Basset^d,
M. Tod^e, P. Girard^e, P. Mismetti^{a,b,f}^aFaculté de Médecine, Université Jean Monnet, EA3065, Saint-Etienne, France^bDepartment of Clinical Pharmacology, Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France^cDepartment of Neurology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France^dLaboratory of Pharmacology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France^eFaculté de Médecine, Université Lyon I, EA3738, CTO, F-69600 Oullins, France^fDepartment of Internal Medicine and Therapeutics, CIE3, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

Keywords

acenocoumarol,
amoxicillin,
drug–drug interaction,
indirect response model,
pharmacokinetic–
pharmacodynamicReceived 20 March 2008;
revised 9 July 2008;
accepted 13 August 2008*Correspondence and reprints:
xavier.delavenne@
chu-st-etienne.fr

ABSTRACT

A pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK–PD) drug–drug interaction between acenocoumarol and amoxicillin + clavulanic acid antibiotic was assessed in eight healthy volunteers, using a population PK–PD model. Each subject received at day 1 a single dose of 8 mg of acenocoumarol. Then 1 g of amoxicillin + 250 mg of clavulanic acid was given from days 3 to 9. On day 8, each subject received a single dose of 8 mg of acenocoumarol concomitantly with the antibiotic combination. Eleven blood samples were taken during 48 h following each acenocoumarol administration. Acenocoumarol plasma concentrations and prothrombin time were measured at each sampling time. We first identified the structural PK model by pooling data from this trial with individual data from other acenocoumarol PK trials. An indirect response model was used to fit PD data. Models were built using a non-linear mixed effect modelling approach with NONMEM software. Covariates were tested on PK and PD parameters, including antibiotic treatment. Acenocoumarol PK data were fitted by a two-compartment, first-order input model with log normal inter-individual variability. Weight and antibiotic treatment were found to improve significantly the fit of PK data with a 15% decrease in acenocoumarol clearance with concomitant antibiotics ($P < 0.05$). An indirect response model was successfully applied to the PK–PD data of acenocoumarol. No covariate, including antibiotic treatment effect, significantly affected PT. Drug–drug interaction was demonstrated at the PK level, without any PD corollary.

INTRODUCTION

Oral anticoagulants, belonging to the class of vitamin K antagonists (VKA), have been used throughout the world for several decades. Their main indications are the treatment and prophylaxis of venous and arterial thromboembolism, the incidence of which increases after the age of 60 years. Consequently, oral anticoagulants are being prescribed to a steadily increasing number of

patients as a long-term therapy, particularly elderly patients.

Acenocoumarol is one of the most widely used oral anticoagulants in continental Europe. Like other coumarins, it has a narrow therapeutic index and shows a high inter- and intra-individual variability in patient response. The anticoagulant response to acenocoumarol is influenced by genetic factors (genetic polymorphism of hepatic enzymes involved in acenocoumarol metabolism),

pharmacokinetic (PK) factors, including drug–drug interactions, pharmacodynamic (PD) factors and environmental factors. For these reasons, oral anticoagulant treatment must be monitored by repeated biological tests. Prothrombin time (PT), expressed as the international normalized ratio (INR) is the most common method for monitoring oral therapy [1]. An INR of 2.0–3.0 is recommended for most indications [2]. The challenge is to achieve an anticoagulant effect while avoiding haemorrhagic complications. Antibiotic interactions are recognized to be a major cause of over-anticoagulation especially by modifying the intestinal flore involving a decrease in synthesis of vitamin K. Little is known about amoxicillin plus clavulanic acid interactions in particular. Amoxicillin + clavulanic acid is a broad-spectrum antibiotic combination, with a wide range of indications, that is frequently prescribed at the same time as oral anticoagulants. However, a review of the interaction between oral anticoagulants and either amoxicillin alone or amoxicillin + clavulanic acid revealed seven case reports and one prospective case–control study [3–8] suggesting a risk of over-anticoagulation when VKA are associated with these antibiotics.

Accordingly, the aim of our study was to determine a possible PK and/or PD interaction between acenocoumarol and amoxicillin plus clavulanic acid using a non-compartmental analysis and a population PK–PD model based on an indirect response model.

PATIENTS AND METHODS

Subjects

Eight healthy, male, Caucasian subjects with normal body weight (60–80 kg) participated in the study after giving their written informed consent. The study was performed in accordance with the principles of the declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Rhône Alpes Loire. Before enrolment, all subjects underwent a medical examination by a physician, as well as routine blood chemistry tests. The screening examination included assay of serum electrolytes, creatinine, γ -glutamyltransferase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total protein and triglycerides and testing for hepatitis B surface antigen and HIV antibodies.

All medications other than acenocoumarol and amoxicillin + clavulanic acid were prohibited during the study. Exclusion criteria included a history of haemorrhagic phenomena, evidence of abnormalities at the screening examination or abnormal laboratory test

values and concomitant use of other treatments or conditions within 3 months prior to inclusion.

Study design

The study included two 48-h test periods (*Figure 1*). At the start of each of these periods, a blood sample was taken and a single dose of 8 mg of acenocoumarol was given orally. Further blood samples were then taken up to 48 h following acenocoumarol administration. Then, 1 g of amoxicillin plus 250 mg of clavulanic acid were given orally twice a day for 7 days. After 6 days of administration of amoxicillin + clavulanic acid, 8 mg of acenocoumarol was given orally once again, which means a wash-out period of 6 days between two administration of acenocoumarol, then without any expected residual effect [9]. Then, 11 blood samples were taken during 48 h. To avoid any bias, the environment of the subjects was controlled during both periods of hospitalization; the time of going to bed and getting up and the food provided were standardized.

Blood sampling

Twelve blood samples were collected during 48 h after each acenocoumarol administration ($t = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 13, 24, 31, 48$ h). The blood samples were immediately centrifuged and the plasmas were stored at -20°C . Acenocoumarol concentrations and prothrombin time ratios (PT_r) were measured on each blood sample.

Analytical methods

Acenocoumarol concentrations were assayed by high pressure liquid chromatography at room temperature, using a reversed-phase C18 column, Lichrosorb SRP18, 15×4.6 mm (CHROMPACK, Middelburg, The Netherlands). The plasmas were first subjected to organic extraction with petroleum ether and dichloromethane (50 : 50 v/v). The mobile phase comprised acetic

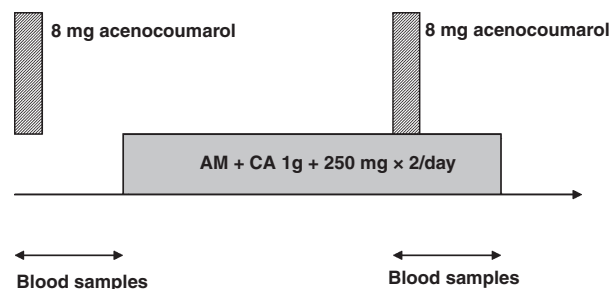


Figure 1 Schematic representation of study design.

acid-acetonitril and sodium phosphate buffer (pH 5, 80 : 20 v/v). The lower limit of quantification was 15 ng/mL and the upper limit was 500 ng/mL. The inter-assay coefficients of variation were less than 10%. Recovery was between 100% and 105%.

Prothrombin time (PT) was measured using the Thrombotest reagent (Neoplastin Automate Reagent, Diagnostica Stago) and the results were expressed as the PTr:

$$\text{PTr} = \frac{\text{PT}_{\text{control}}}{\text{PT}_{\text{patient}}}$$

Non-compartmental analysis

Area under the curve ($\text{AUC}_{0-\infty}$) was calculated using the linear trapezoidal rule from 0 to the last quantifiable time point and the extrapolated AUC from the last quantifiable time point to infinity using the slope estimated from the terminal log-transformed elimination phase. An analysis of variance (ANOVA) was performed on $\text{AUC}_{0-\infty}$, after natural logarithmic transformation. In accordance with regulatory authority guidelines, the geometric mean ratio and 90% confidence interval of $\text{AUC}_{0-\infty}$ of acenocoumarol plasma concentrations were estimated for testing bioequivalence between the study phases [10,11]. The limits for acceptance of bioequivalence were set at 0.8–1.25. Statistical calculations were performed using the S-PLUS statistical software package (version 6.1; Insightful Corp., Seattle, WA, USA).

Pharmacokinetic model

Basic pharmacokinetic model

The structural PK model of acenocoumarol in healthy volunteers could not be established using the only eight available subjects. The PK data obtained were therefore completed with data from other studies, according to individual data meta-analysis methodology including three studies [12]: one pharmacogenetic study in 23

subjects, one study monitoring oral anticoagulant markers in eight subjects and the data from the eight subjects and only first period of present study (Table I) [13,14]. We explored various structural models, one- and two-compartment disposition with linear elimination, first-order oral absorption and absorption lag time. The parameters estimated by the model comprised apparent clearance (Cl/F), apparent central volume of distribution (V_2/F), apparent peripheral volume of distribution (V_3/F), intercompartmental clearance (Q/F), absorption rate constant (K_a) and lag time (Lag). Inter-individual variability of PK parameters was considered to be log-normal. For instance, variability in clearance was described by the equation:

$$\text{Cl}/F = \theta_x \times \exp(\eta_x)$$

where θ_x , the typical value of clearance and η_x , the inter-individual random effect, with a mean of 0 and variance ω^2 . Several error models (proportional, exponential and additive) were investigated to describe residual variability. The structural model of acenocoumarol was then applied to the eight subjects and two periods of our study. Inter-occasion variability was not assessed because it was confounded with the co-medication factor.

The nonlinear mixed effect modelling software program NONMEM (NONMEM version VI, level 1.1; University of California, San Francisco, CA, USA) was used for PK analysis [15,16]. The first-order conditional estimates method (FOCE) with the INTERACTION option implemented in NONMEM was chosen for the estimation. Model selection was based on visual inspection of goodness-of-fit plots, the precision of parameter estimates and a decrease in objective function (OVF) of >3.84 in the likelihood ratio test (χ^2 , $P < 0.05$; 1 d.f.).

Table I Studies included in meta-analysis.

	Population	Blood sampling	Amount	Population characteristics
Study 1 (this study) $n = 8$	Healthy volunteers	$T = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 13, 24, 31$	Day 1: 8 mg	Age: 24 ± 3 (20–29) Weight: 68 ± 9 (60–76) Gender: 8 men
Study 2 [14] $n = 23$	Healthy volunteers	$T = 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24$	Day 0: 4 mg Day 1: 4 mg	Age: 27 ± 8 (19–46) Weight: 70 ± 10 (55–89) Gender: 20 men
Study 3 [13] $n = 8$	Healthy volunteers	$T = 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30$	Day 1: 12 mg	Age: 25 ± 2 (20–26) Weight: 72.5 ± 9 (60–85) Gender: 8 men

Selection of covariates and testing of drug–drug interaction

Data analysis was performed on Bayesian PK parameter estimates obtained from the basic model selected. The distribution shapes and relationships between covariates and individual parameter estimates were examined using the S-PLUS statistical software package (version 6.1; Insightful Corp., Seattle, WA, USA). The covariates of interest, especially amoxicillin + clavulanic acid effect, were entered into the model. The linear influence of continuous covariates was modelled according to the following equation, using Cl/F for example,

$$\text{TVCl} = \theta_{\text{Cl}} \times \left(\frac{\text{BSA}}{\text{median}(\text{BSA})} \right)^{\theta_{\text{BSA}}}$$

where TVCl, the typical value of the population parameter estimate Cl, θ_{Cl} , the value for a subject with the median covariate value, BSA, body surface area and θ_{BSA} is the estimated influential factor for BSA.

Categorical covariates, including the treatment effect (θ_{ttr}), were modelled according to the following equations:

$$\begin{aligned} \text{TVCl} &= \theta_{\text{Cl}} \quad \text{in subjects without amoxicillin} \\ &\quad + \text{clavulanic acid} \\ \text{TVCl} &= \theta_{\text{Cl}} \times \theta_{\text{ttr}} \quad \text{in subjects with amoxicillin} \\ &\quad + \text{clavulanic acid} \end{aligned}$$

Covariates with a statistically significant effect were incorporated in the model. A decrease in the OVF of at least 3.84 was required to identify a significant covariate. Next, the full model was defined by incorporating all the significant covariates. The analysis continued with the stepwise deletion of covariates from the full model to define the minimum number of important covariates. The outcome of this procedure was the final model.

Goodness-of-fit plots and pharmacokinetic model validation

The goodness-of-fit of the model was established by plotting the population predictions of the model vs. observations, the individual predictions vs. observations, as well as weighted residuals vs. time. The precision of population parameters was calculated by using the bootstrap method (100 samples) [17]. As the few data obtained in this study did not allow an external validation, the visual predictive check (VPC) simulation technique was used as an internal validation [18]. The VPC was generated by simulating 500 times the parameters of the eight subjects [19]. The final replicated model was compared to the observations. The precision of the model was evaluated by visual inspection of the distribution of

simulated concentrations from the simulated parameters. Furthermore, the median parameter values and 95% prediction intervals of the VPC replicates were compared with the estimates of the original data set.

Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis

Acenocoumarol exerts an anticoagulant effect by inhibiting the vitamin K-dependent coagulant factor in the liver. The lag time for development of a response after the drug reaches the site of action can be modelled by an indirect action model. A PD model was built for PTr. The model comprised one nested E_{max} model in a turn-over model:

$$\frac{d\text{CF}}{dt} = K_{\text{in}} \cdot \left(1 - \left(\frac{\text{Cp}^\gamma}{\text{Cp}^\gamma + \text{C}_{50}^\gamma} \right) \right) - K_{\text{out}} \cdot \text{CF} \quad (1)$$

$$\text{PTr} = \text{PTr0} \times \frac{\text{CF}^\lambda}{\text{CF}_{50}^\lambda + \text{CF}^\lambda} \quad (2)$$

The first differential equation of the model is similar to the indirect-response model (inhibition of response production) used for other VKA, such as warfarin and fludione [20–22].

In this equation, where CF, the clotting factors (the measured response), K_{in} , the apparent zero-order rate constant for production of the response, K_{out} , the first-order rate constant for loss of the response and γ , the shape parameter of the hyperbolic function; Cp and C_{50} , the concentration of acenocoumarol and the concentration of acenocoumarol that reduces the clotting factor synthesis rate by 50%, respectively.

The second equation of the model is the function that links the concentration of clotting factors to the biomarker (PTr). PTr0 is the baseline value of the effect without treatment, CF_{50} the concentration of CF that produces half of the maximum response and λ the shape parameter.

Detection of covariates and validation model procedures were the same as those described for the PK model. Computer modelling for PK/PD was performed using NONMEM software with FOCE interaction method.

RESULTS

Data description

Table II summarizes the characteristics of the subjects, all of whom completed the study. The median (range) age was 23 years (20–29) years, height 178.5 cm (164–186) and weight 65 kg (60–76).

Non-compartmental study

The results of the primary bioequivalence analysis are summarized in *Table III*. The mean difference in the value of the AUC of plasma concentration between the period with and without administration of amoxicillin + clavulanic acid (340.8 ± 273.1 ng/h/mL) is positive. In contrast to the PK data, the mean difference in the area above the curve (AAC) of PTR between the period with and without administration of amoxicillin + clavulanic acid ($-88.6 \pm 400.6\%/h$) is negative, with a wide dispersion. The geometric mean ratio (with/without treatment) for $AUC_{0-\infty}$ was 1.18 (90% CI: 1.08–1.29). Based on the accepted requirement for bioequivalence of 0.8–1.25, the results provided evidence for a drug–drug interaction with amoxicillin + clavulanic acid (*Figure 2*). The geometric mean ratio (with/without treatment) for $AAC_{0-\infty}$ is 1.14 (90% IC: 0.99–1.31).

Population PK model

In view of the positive result of the non-compartmental analysis, we fitted the PK/PD data to try to identify the mechanism of this potential interaction. Modelling was performed in two steps: PK then PK/PD. The first step consisted of identifying the structural PK model for acenocoumarol, based on the meta-analysis, then estimating the PK parameters of our data. The second step comprised the estimation of PD parameters according to the individual Bayesian PK parameters.

The one-compartment and two-compartment models were fitted to the model development data. The two-compartment, first-order input model, with log normal inter-individual variability in clearance (Cl/F), central volume compartment (V_2/F) and peripheral volume (V_3/F) and a covariance block between Cl/F and V_2/F , including a multiplicative residual variance, was found to be the most suitable basic structural model. The chronology of the modelling process was based on the

Table III Per cent change in bioequivalence parameters between without antibiotic and with antibiotic.

Subject	Increase in AUC of pharmacokinetic data (% change)	Increase in AAC of pharmacodynamic data PTR (% change)
1	+23.8	+47
2	+2.1	–11
3	+30	–51
4	+35.5	+102
5	+22.6	–0.6
6	+10.9	–29
7	+44.8	–6
8	–4.8	–22.5
Mean \pm SD	20.6 \pm 16.9	3.6 \pm 48.7

AUC, area under the curve; AAC, area above the curve; SD, standard deviation; PTR, prothrombin time ratio.

likelihood ratio test. The estimation of PK parameters according to the structural model is presented in *Table IV*. The relationships between covariates and the PK of acenocoumarol were assessed. A significant improvement in fit was obtained by integrating the body weight on central compartment volume (V_2/F) and the treatment effect on elimination clearance (Cl/F). Incorporation of these covariates significantly reduced the unexplained inter-individual variability and the OVF ($P < 0.05$). Inter-individual variability of Cl/F and V_2/F , expressed as the coefficient of variation, decreased from 12.2% to 5.1% and from 16.7% to 2.1% respectively. The elimination clearance of acenocoumarol varied as a function of amoxicillin plus clavulanic acid administration and increased by 15% with this treatment. All covariates were kept after a backward elimination procedure. The final parameters are presented in *Table IV*.

Table II Characteristics of subjects.

Subject characteristics	Median (min.–max.)
Number of subjects	8
Age (years)	23 (20–29)
Body mass index (kg/m ²)	22.1 (18.5–26.2)
Body surface area (m ²)	1.8 (1.7–2)
Fibrinogen (g/L)	1.8 (1.4–2.1)
Height (cm)	178.5 (164–186)
Activated cephalin time (s)	32.5 (37.5–28)
Prothrombin time ratio (%)	89.5 (72–100)
Weight (kg)	65 (60–76)

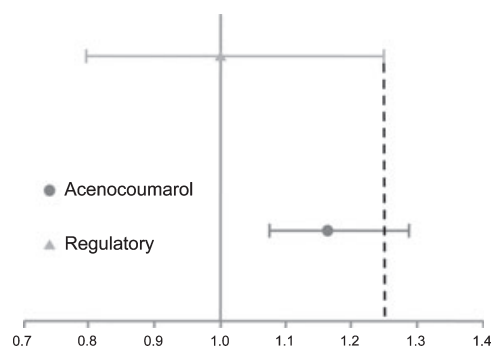


Figure 2 Bioequivalence confidence interval.

Table IV PK/PD parameters.

Parameter	Population estimates (SE)	Inter-individual variability (SE)
CL (L/h)	4.08× (0.875 if antibiotic) (9.6)	5.1 (47)
V ₂ (L)	24.5× [Wt/median (Wt)] (1.8)	2.1 (51)
Cov CL-V ₂		0.13 (23)
Q (L/h)	1.8 (6)	0 fixed
V ₃ (L)	11.8 (35.2)	0 fixed
K _a (1/h)	4.04 (10)	79 (30.7)
Lag (h)	0.404 (12.7)	14.5 (8.2)
K _{in} (1/h)	0.175 (3.5)	0.86 (31.8)
C ₅₀ (mg/L)	1.69 (14.7)	52.2 (5.6)
PTr ₀ (%)	94.4 (0.3)	6.47 (5.6)
CF ₅₀ (mg/L)	0.0510 (31)	0 fixed
Residual variability on PK (%)	23.8 (28)	
Residual variability on PD (%)	27.8 (32)	

SE, standard error of estimate expressed as coefficient of variation in %.

Goodness-of-fit and pharmacokinetic model validation

The standard diagnostic plots for the basic and covariate models illustrated in Figure 3 show no apparent bias in model predictions. Figure 4 presents the results of the

VPC, showing that PK observed data are included in the 95% envelope of the feigned values, defined by the 2.5% and 97.5% and showing the good predictive properties of the model.

Population PK/PD model

Pharmacokinetic individual predictions, computed using the (so called NONMEM post hoc) empirical Bayesian estimate of the PK model, were plugged into the PK/PD model. The observed PTr were fitted by combining two E_{\max} models. The model tested included seven parameters in its PD part ($K_{in} = K_{out}$, C_p , C_{50} , PTr_0 , CF_{50} , γ and λ). The parameters K_{in} and C_{50} included the inter-individual variability. The residual variability was best described using an additive error model. The shape parameters, γ and λ , on the two hyperbolic functions did not significantly improve the OFV and so were fixed to 1.

None of the covariates, including, in particular, the treatment effect, had any significant influence on the PD parameters. The final PD parameters are summarized in Table IV.

Goodness-of-fit PK/PD model validation

The descriptive quality of the model is illustrated in Figure 3. The final model was evaluated by a VPC (500

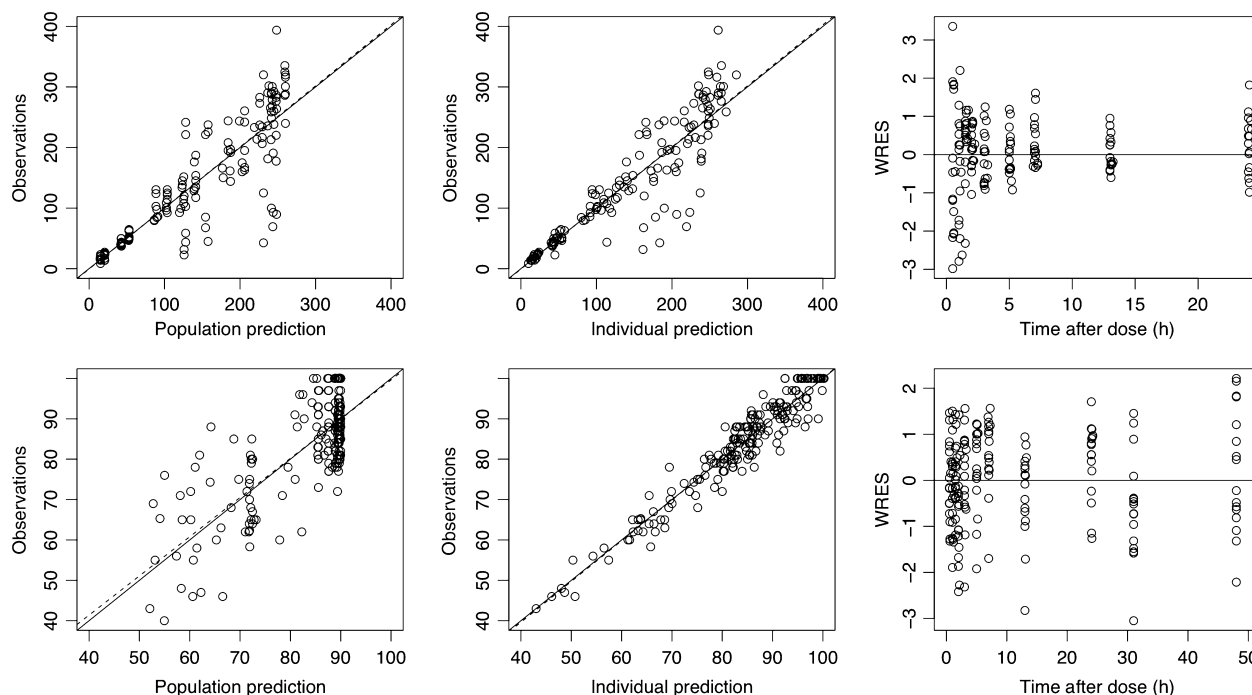


Figure 3 Basic goodness-of-fit plots. PK observations are acenocoumarol plasma concentrations (mg/L); PD observations are PTr (%); the solid line represents the line of identity; the dash line represents the regression line.

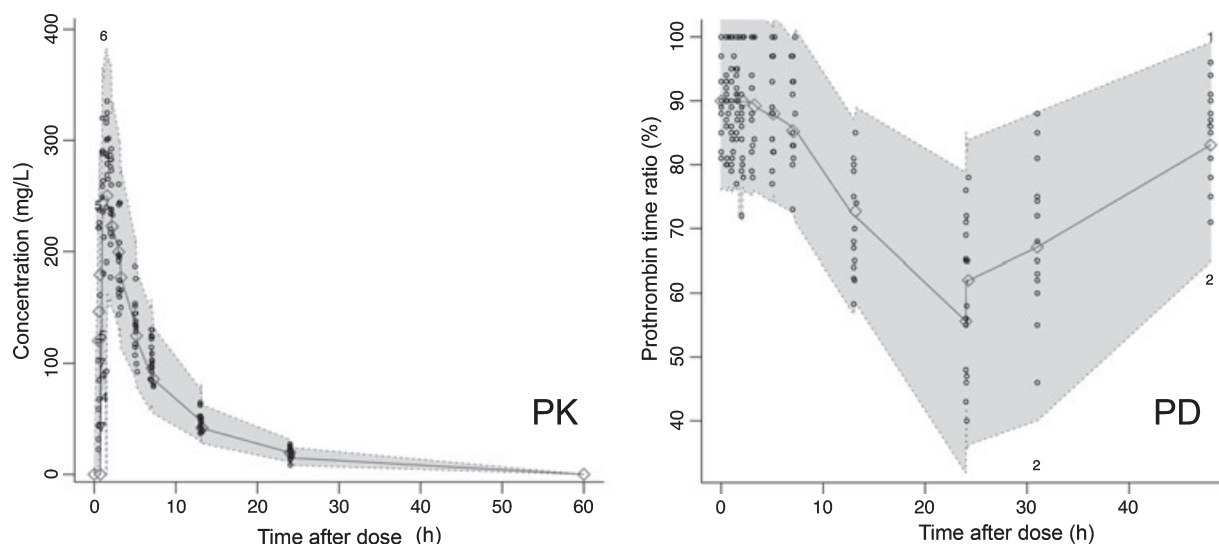


Figure 4 Visual predictive check. The envelope represents the 95% confidence interval of simulations; the circles denote the observations; the numbers denote the observations outside and the black points denote the observations inside this interval.

replicates). *Figure 3* shows that most of the data are included in the 95% envelope of the feigned values, demonstrating the ability of model to predict the observations.

DISCUSSION

The non-compartmental analysis shows a significant increase in the AUC of acenocoumarol in the presence of amoxicillin + clavulanic acid. Such a difference in bioavailability is normally reflected in a clinical modification. In this case, however, it does seem to affect the PD of acenocoumarol, as the mean AAC of PTR is in fact lower when the antibiotic combination is co-administered. PK/PD modelling corroborates the modification of acenocoumarol PK by amoxicillin + clavulanic acid. This modification is expressed by a statistically significant 15% decrease in acenocoumarol clearance and thus a proportionate increase in the AUC of acenocoumarol.

The assessment of drug–drug interaction between acenocoumarol and amoxicillin plus clavulanic acid is based on two types of analysis. An initial non-compartmental analysis, based on bioequivalence studies, permitted easy detection of a change in acenocoumarol PK with co-administration of the antibiotic combination. The second analysis, based on modelling of acenocoumarol PK/PD, was used to identify the mechanism of the drug–drug interaction by introducing a covariate ‘treatment effect’. This more complex analysis is more

powerful in highlighting the interaction, particularly for drugs showing marked variability in this respect [23].

Could this drug–drug interaction be the result of an artifact? First, there is no evident pharmacological mechanism that could explain this interaction, because the drugs involved have completely different PK. The weak binding of amoxicillin + clavulanic acid to plasma proteins (<20%) eliminates the possibility of competition for protein binding sites. Furthermore, both components of the amoxicillin + clavulanic acid combination are essentially eliminated unchanged in the urine, thereby excluding a possible metabolic interaction. Secondly, this drug–drug interaction could be an artifact related to the limitations of modelling. The absorption phase is not well estimated. The inter-individual variance in the parameter K_a parameter is >90%, expressed as the coefficient of variation. However, this phase modifies neither exposure to acenocoumarol nor the half-life of the drug. The drug–drug interaction detected could also be the consequence of a bias in the study design. In fact, as the study was not conducted in a cross-over design, it was not possible to incorporate, as recommended, an inter-occasion variability in the model and the interaction was only assessed in the second occasion [24]. On this assumption, the interaction might be because of a period effect. However, this particular design was chosen because of the very long known residual hepatic effect of amoxicillin + clavulanic acid [25].

Several hypotheses could explain the lack of such an effect. First, we may evoke the lack of power of the

study. The eight subjects included in this study were possibly an insufficient number in view of the wide inter- and intra-variability of acenocoumarol. The second hypothesis concerns the inadequate design and population of the study. The young population and single dose administration do not represent the usual framework for the use of acenocoumarol. Although single-dose administration is widely employed in drug–drug interaction studies, the lack of any PD effect in this context does not necessarily imply the absence of such an effect with chronic administration of acenocoumarol [26]. The third hypothesis relates to the too high dose of acenocoumarol. We chose a high dose, namely 8 mg of acenocoumarol. With regard to the value of C_{50} (Table IV), this dose generates a maximum effect, so it would be difficult to observe a greater effect with co-administration of the antibiotic combination. Finally, it could be because of a real lack of drug–drug interaction.

This study is the first to describe a PK/PD model for acenocoumarol and it also represents the first use of an indirect response model for assessing drug–drug interaction. From the PK standpoint and from the point of view of regulatory authorities, our study evidenced a drug–drug interaction between acenocoumarol and amoxicillin plus clavulanic acid. Modelling showed a 15% decrease in the clearance of acenocoumarol in with co-administration of the antibiotic combination. However, this modification was not confirmed at the clinical level. For the time being, no modification of clinical practices can be considered. We propose to confirm these results by conducting a further study with greater power. On the basis of simulations, we could then suggest an appropriate dosage of acenocoumarol to assess drug–drug interaction. This new study could include the assay of acenocoumarol isomers and genetic profiling of CYP 2C9 and epoxy vitamin K reductase as the major determinants of the variability in response to VKA.

REFERENCES

- Quick A. The prothrombin time in haemophilia and in obstructive jaundice. *J. Biol. Chem.* (1935) **109** 73–74.
- Hirsh J., Dalen J., Anderson D. *et al.* Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* (2001) **119** 8–21.
- Bandrowsky T., Vorono A., Borris T. *et al.* Amoxicillin-related postextraction bleeding in an anticoagulated patient with tranexamic acid rinses. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* (1996) **82** 610–612.
- Cauli C., Fenu L., Perra A. *et al.* Amoxicillin–clavulanic acid and oral anticoagulants: a possible dangerous association. *Ann. Ital. Med. Int.* (2004) **19** 276–279.
- Conly J., Stein K. Reduction of vitamin K2 concentrations in human liver associated with the use of broad spectrum antimicrobials. *Clin. Invest. Med.* (1994) **17** 531–539.
- Davydov L., Yermolnik M., Cuni L.J. Warfarin and amoxicillin/clavulanate drug interaction. *Ann. Pharmacother.* (2003) **37** 367–370.
- Penning-van Beest F.J., van Meegen E., Rosendaal F.R. *et al.* Stricker BH. Drug interactions as a cause of overanticoagulation on phenprocoumon or acenocoumarol predominantly concern antibacterial drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* (2001) **69** 451–457.
- Soto J., Sacristan J.A., Alsar M.J. *et al.* Probable acenocoumarol–amoxycillin interaction. *Acta Haematol.* (1993) **90** 195–197.
- Tardy B., Tardy-Poncet B., Laporte-Simitsidis S. *et al.* Evolution of blood coagulation and fibrinolysis parameters after abrupt versus gradual withdrawal of acenocoumarol in patients with venous thromboembolism: a double-blind randomized study. *Br. J. Haematol.* (1997) **96** 174–178.
- EMA. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. Available at: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/140198en.pdf>, 2000.
- FDA. Guidances for industry: in vivo drug metabolism/drug interaction studies – study design, data analysis and recommendations for dosing and labeling. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/2635fnl.pdf>, 1999.
- Laporte-Simitsidis S., Girard P., Mismetti P. *et al.* Inter-study variability in population pharmacokinetic meta-analysis: when and how to estimate it? *J. Pharm. Sci.* (2000) **89** 155–167.
- Mismetti P., Laporte L., Girard P. *et al.* Indirect pharmacodynamic model with two different markers of oral anticoagulant in young healthy volunteers. Available at: <http://www.page-meeting.org/?abstract=283>. Page 7 (Abstr 283), 1998.
- Verstuyft C., Robert A., Morizot J.M. *et al.* Effects of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase multiprotein complex (VKORC1) polymorphisms on flutidione anticoagulation status. *Fun. Clin. Pharmacol.* (2006) **20** 145–234 (Abstr 28).
- Beal S.L., Sheiner L.B. Estimating population kinetics. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* (1982) **8** 195–222.
- Beal S.L., Sheiner L.B. *NONMEM users guides*. University of California, San Francisco, CA, 1992.
- Efron B., Tibshirani R.J. *An introduction to the bootstrap*. Chapman and Hall, New York, 1993.
- Holford N. The visual predictive check superiority to standard diagnostic (Rorschach) plot. Available at: <http://www.page-meeting.org/?abstract=738>. Page 14 (Abstr 738), 2005.
- Brendel K., Dartois C., Comets E. *et al.* Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin. Pharmacokinet.* (2007) **46** 221–234.
- Mentre F., Poussel F., Comets E. *et al.* Population pharmacokinetic–pharmacodynamic analysis of flutidione in patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* (1998) **63** 64–78.

- 21 Nagashima R., O'Reilly R.A., Levy G. Kinetics of pharmacologic effects in man: the anticoagulant action of warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther.* (1969) **10** 22–35.
- 22 Dayneka N.L., Garg V., Jusko W.J. Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic responses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* (1993) **21** 457–478.
- 23 Panhard X., Mentre F. Evaluation by simulation of tests based on non-linear mixed-effects models in pharmacokinetic interaction and bioequivalence cross-over trials. *Stat. Med.* (2005) **24** 1509–1524.
- 24 Karlsson M.O., Sheiner L.B. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* (1993) **21** 735–750.
- 25 Horsmans Y., Larrey D., Pessayre D. et al. Hepatotoxicity of antimicrobial agents. I: Antibacterial antibiotics. *Gastroenterol. Clin. Biol.* (1990) **14** 911–918.
- 26 de Hoon J.N., Thijssen H.H., Beysens A.J. et al. No effect of short-term omeprazole intake on acenocoumarol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (1997) **44** 399–401.

Population pharmacokinetics of fondaparinux administered at prophylactic doses after major orthopaedic surgery in everyday practice

Xavier Delavenne^{1,2}; Paul Zufferey^{1,3}; Denis Baylot⁴; Philippe Nguyen⁵; Jeanne-Yvonne Borg⁶; Michaela Fontenay⁷; Beatrice Deygas^{2,8}; Patrick Mismetti^{1,2}; Silvy Laporte^{1,2,8}; for the GETHCAM study group and POP-A-RIX investigators*

¹Thrombosis Research Group (EA 3065), University Jean Monnet, Saint-Etienne, France; ²Clinical Pharmacology Dept., University Hospital, Saint-Etienne, France; ³Anesthesiology and Intensive Care Dept., University Hospital, Saint-Etienne, France; ⁴Clinique Mutualiste de Saint-Etienne, France; ⁵Central Hematology Laboratory, Robert Debré Hospital, Reims, France; ⁶Hemostasis Unit, University Hospital of Rouen, France; ⁷Hematology Laboratory, Cochin Hospital, Paris, France; ⁸Inserm, CIE3, Saint-Etienne, France

Summary

Fondaparinux is a synthetic antithrombotic agent with specific anti-factor Xa activity. A population pharmacokinetic model of fondaparinux, based on data obtained in patients included in phase II/III trials, has been described. However, the validity of this model in everyday practice needed to be confirmed. This study was a multicenter, prospective cohort study in consecutive orthopaedic patients treated with 2.5 mg of fondaparinux. Anti-Xa activities were recorded in 809 patients. Population parameters and inter-individual variability were estimated using NONMEM VI software. A two-compartment model with first-order ab-

sorption best described fondaparinux pharmacokinetics. Covariates partly explaining inter-individual variability were body weight, age and creatinine clearance estimated by the simplified Modification of Diet in Renal Disease formula (MDRD). A body weight less than 50 kg and moderate renal failure increased drug exposure. Although the population pharmacokinetic model of fondaparinux was described, this one requires to be validated in everyday practice.

Keywords

Fondaparinux, orthopedic surgery, pharmacokinetics, simulations

Correspondence to:

Dr. Xavier Delavenne
Pharmacology and Toxicology Laboratory
University Hospital of Saint-Etienne
42055 Saint-Etienne, France
Tel.: +33 4 7712 0572, Fax: +33 4 7712 7820
E-mail: xavier.delavenne@chu-st-etienne.fr

Financial support:

The POP-A-RIX study has received funding support from the Ministère de la Santé-France- Programme Hospitalier de Recherche Clinique and was promoted by the University Hospital of Saint Etienne. The study was also supported by a grant from Fédération Hospitalière de France, Leem "Année Recherche Clinique" 2006. The first author has received the prize "jeune chercheur" from the "Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique" 2009.

Received: February 18, 2010

Accepted after minor revision: April 2, 2010

Prepublished online: June 10, 2010

doi:10.1160/TH10-02-0127

Thromb Haemost 2010; 104: ■■■■

* A list of investigators is given in the Appendix.

Introduction

Fondaparinux is a synthetic, selective factor Xa inhibitor indicated for the prevention of venous thromboembolism in the context of major orthopaedic surgery (1). Compared with enoxaparin, fondaparinux 2.5 mg once daily reduced the occurrence of venous thromboembolism by 55%. However, this higher efficacy was offset by an increased risk of major bleeding (2). Post-hoc analysis showed that the rate of major bleeding was highest when fondaparinux was initiated less than 6 hours (h) following skin closure, and also in the subgroup of 'fragile' patients, including patients weighing less than 50 kg, aged 75 years or more, and/or with moderate renal impairment defined by a creatinine clearance less than 50 ml/minute (min) measured by the Cockcroft-Gault formula (2). Fondaparinux is mainly excreted by the kidneys, with a terminal plasma half-life of 17 to 21 h depending on age (3). Thus repeated administration of fixed doses to patients with low body

weight or renal failure may lead to accumulation, overdose and risk of bleeding events.

Higher levels of anticoagulation, as measured by anti-Xa activities, in patients with renal impairment have previously been suggested on the basis of a population pharmacokinetic model (4). This model used data from randomised, controlled studies in patients receiving fondaparinux for the prevention of thromboembolic events after major orthopaedic surgery (5–7). However, the characteristics of the highly selected patient populations included in these phase II/III trials differed from those of the patient populations treated in clinical practice. In particular, elderly patients, patients with a low body weight and patients with renal impairment constituted a lower proportion of the total population in randomised trials than in observational studies (8, 9). Thus, it is questionable whether this first pharmacokinetic model can be extrapolated to predict fondaparinux pharmacokinetics in the populations treated in routine practice. In addition, the presence

of renal insufficiency was determined using the Cockcroft-Gault formula in the studies forming the basis for these models (10, 11). As an over estimation of the glomerular renal function was described in the elderly patients using the Cockcroft-Gault formula, we also estimated it with the simplified Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula (12–14). We therefore conducted a population pharmacokinetic study of fondaparinux, administered at prophylactic doses in everyday practice, to evaluate its anti-Xa activity profile and the variability of this parameter in patients undergoing major orthopaedic surgery, and to identify the patient characteristics potentially favouring inter-individual variability and accumulation.

Methods

Study design

POPulation at Risk with fondaparinux thromboprophylaxis study (POP-A-RIX) was a multicentre, prospective cohort study in consecutive patients treated with prophylactic doses of fondaparinux after major orthopaedic surgery. Patients were enrolled by the GETHCAM study group (Groupe d'Etude Thrombose Hémostasie en Chirurgie de l'Appareil locomoteur) and POP-A-RIX investigators.

Patients and treatment

All patients requiring fondaparinux 2.5 mg subcutaneously once a day for venous thromboembolism prophylaxis in major orthopaedic surgery for at least five days were eligible for inclusion in the study. Exclusion criteria were contraindication to the use of fondaparinux and requirement for continued anticoagulant therapy. The first dose of fondaparinux was administered at least 6 h post-operatively, the second dose being given 12 h or more after the first. The duration of venous thromboprophylaxis was in accordance with the international guidelines (1). All patients gave their oral consent to participation in the trial. The database was approved by the French consultative committee 'Commission Nationale Informatique et Libertés' and was declared to www.clinicaltrials.gov (NCT01063543).

Data collection and assay methods

One to four blood samples were taken from each patient throughout the treatment period. Plasma concentrations of fondaparinux were determined on the basis of anti-Xa activity according to the same principle as that recommended for low-molecular-weight heparins (LMWH) (15). The sampling times were randomly distributed throughout the intervals between doses from 0 to 24 h.

Factor Xa enzyme activity was measured using several different chromogenic assays and analysers. In some assays, human plasma samples spiked with fondaparinux sodium were used for calibration. Other assays employed commercial LMWH calibration methods, the results being expressed as anti-Xa IU/ml. These values were converted into mg/l by linear regression based on three fondaparinux levels. The calibration curves for fondaparinux covered a range from 0.07 to 1.5 mg/l. At the limit of quantification, namely 0.07 mg/l, the coefficients of variation of accuracy and precision were <10% for all methods.

For each patient, the following demographic data were recorded: sex, age, body weight (BW), height (HT). The following size descriptors were also calculated: body mass index ($BMI = BW/HT^2$), body surface area ($BSA = [(BW \cdot HT)/3600]^{0.5}$). Renal function was estimated by measuring serum creatinine (using an enzymatic or chromogenic method), and creatinine clearance was calculated according to the Cockcroft-Gault formula ($CrCl_{CG}$) and the simplified MDRD formula ($CrCl_{MDRD}$) (12, 13).

Data analysis

Data were analysed using a non-linear mixed effect model implemented in NONMEM software (NONMEM version VI, level 2; ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA) (16). The initial exploratory analyses to determine covariate effects on individual pharmacokinetic parameters and descriptive statistics were performed using SAS software (version 8.2 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Model building

Two data sets were randomly assembled prior to the analyses: a learning dataset comprising two-thirds of the patients ($n=566$) and a validation dataset comprising the remaining third ($n=243$).

Several compartmental models were tested in the population pharmacokinetic analysis. One- and two-compartment models based on zero and first-order absorption were investigated to describe anti-factor Xa activity. Inter-individual variabilities in parameters were considered to be log-normal. For instance, variability in clearance was described by the equation:

$$Cl = \theta_x \times \exp(\eta_x) \quad (\text{Eq. 1})$$

where θ_x is the typical value of clearance and η_x is the inter-individual random effect, with a mean of 0 and a variance of ω^2 .

Several error models (proportional, exponential and additive) were investigated to describe residual variability. The first-order conditional estimates method (FOCE), with the interaction option implemented in NONMEM, was chosen for the estimation. Model selection was based on visual inspection of goodness-of-fit (GOF) plots, the precision of the parameter estimates and a decrease in

objective function of more than 3.84 in the likelihood ratio test (χ^2 , $p < 0.05$; one degree of freedom) (17). Estimates of the individual pharmacokinetic parameters were obtained using empirical Bayesian estimations. Various covariates collected or calculated at inclusion were tested to determine their effect on the pharmacokinetic parameters. Candidate covariates were added to the model if they improved the fit, as judged by a decrease in the objective function of more than 3.84 in the likelihood ratio test (χ^2 , $p < 0.05$; one degree of freedom). A procedure of backward elimination of each significant covariate was then implemented (18). Covariates were excluded if the minimum objective function did not increase by more than 6.6 (χ^2 , $p < 0.01$; one degree of freedom).

Model evaluation procedures

The final model was evaluated using two strategies.

First, an internal validation was performed, consisting of a visual inspection of the GOF plots and a Visual Predictive Check (VPC) simulation applied to the learning dataset (19). The VPC was generated by simulating 1,000 times the parameters of the dataset. The final replicated model was compared to the observations. The precision of the model was evaluated by visual inspection of the distribution of simulated concentrations derived from the simulated parameters. Furthermore, the median parameter values and 95% prediction interval of the VPC replicates were compared with the estimates based on the original data set (20).

Second, an external evaluation was performed, comprising application of the POP-A-RIX model developed on the learning database to the validation database observations. The bias and precision of the predictions were assessed by computing the mean predicted error (ME) and the mean squared error (MSE) according to the following equations (21):

$$ME = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (C_{pred} - C_{obs}) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$MSE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (C_{pred} - C_{obs})^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

where C denotes anti-Xa activity.

Finally, we also applied the previous model developed on the basis of the phase II/III studies of fondaparinux to indirectly compare the performance of the two models (4).

Bayesian prediction and simulation

The final population pharmacokinetic parameters were used for simulations in NONMEM. A total of 5,000 patients receiving 2.5 mg of fondaparinux once daily during seven days were simulated as well as a lower dosage of 1.5 mg. The latter is recommended by

regulatory authorities in renal impaired patients. Six different groups of patients were chosen to illustrate the predictions of the model: renally impaired patients ($\text{CrCl}_{\text{MDRD}} < 60 \text{ ml.min}^{-1}$) and normal patients; low body weight ($< 50 \text{ kg}$) and normal body weight patients; elderly (age > 85 years) and non-elderly patients (22). After the 7th dose (d7), area under the curve over 144–168 h (AUC_{d7}), maximal concentration (Cmax_{d7}) and trough concentration of fondaparinux (Cmin_{d7}) were calculated for all groups. The geometric means of AUC_{d7} , Cmax_{d7} and Cmin_{d7} were compared between the groups using the Wilcoxon rank sum test with the Bonferroni correction.

Concentration-time courses were simulated for four typical subjects: i) a typical non-fragile patient undergoing total hip replacement, ii) a typical non-fragile patient undergoing knee replacement, iii) a typical patient undergoing hip fracture surgery and receiving 2.5 mg of fondaparinux once daily, and iv) a typical patient undergoing hip fracture surgery and receiving 1.5 mg of fondaparinux once daily.

Results

Patient data

A total of 999 patients were included in the POP-A-RIX study; 190 patients were excluded from the population pharmacokinetic analysis on the grounds of an inappropriate anti-Xa activity assay (calibration with LMWH). The characteristics of the total patient population and the patients included in each dataset are presented in ► Table 1. The mean age of the patients was 74.1 ± 13 years and 16% of patients were over 85 years old. Most of the patients were women (73%). Overall, 10% of patients had a low body weight ($< 50 \text{ kg}$) and 24% were considered as obese ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$). With regard to renal insufficiency, 23% of subjects presented moderate or severe renal failure ($\text{CrCl}_{\text{C\&G}} < 50 \text{ ml.min}^{-1}$) according to the Cockcroft-Gault formula, but only 10.1% according to the MDRD formula ($\text{CrCl}_{\text{MDRD}} < 60 \text{ ml.min}^{-1}$). The indications for fondaparinux treatment were prevention of deep venous thromboembolism after major orthopaedic surgery: total hip replacement (33%), partial hip fracture repair (36%), total knee replacement (26%) and other procedures (5%). The mean duration of fondaparinux treatment was eight days.

Sampling data

A total of 2,029 plasma anti-Xa activities were recorded and used for the modeling process. The average number of measurements per patient was 2.5 (65% of patients had at least three measurements). A total of 101 activities below the limit of quantification were excluded.

Table 1: Demographics and clinical data of study population.

	Total hip replacement	Knee replacement	Fracture surgery	Other	Total	Learning dataset	Validation dataset
Number of patients	226	173	360	50	809	566	243
% of women	59	73	83	60	73	75	68
Body weight (kg)	75.2 [45 - 172]	78 [40 - 130]	60.6 [35 - 120]	75 [45 - 130]	69.4 [35 - 172]	69.6 [35 - 172]	69 [35 - 120]
% subjects with a BW < 50 kg	7.5	3.5	29.3	6.1	10.5	10.1	11.5
Age (years)	68 [27 - 89]	70.5 [19 - 89]	81.2 [43 - 100]	63.5 [69 - 95]	74.1 [19 - 100]	74.4 [19 - 99]	73.5 [28 - 100]
% subjects aged > 85 years	3.5	0.6	42.5	6	16.2	15.2	18.5
Body surface area (BSA) (m ²)	1.9 [1.4 - 2.6]	1.9 [1.3 - 2.6]	1.6 [1.2 - 2.3]	1.9 [1.4 - 2.4]	1.8 [1.2 - 2.6]	1.76 [1.2 - 2.3]	1.76 [1.2 - 2.6]
Body mass index (BMI) (kg/m ²)	27.5 [15.8 - 54]	29.5 [17 - 49.3]	23.2 [13 - 50.6]	27.3 [18.7 - 54]	26.3 [13 - 54]	26.4 [13 - 54]	26 [15 - 50]
% subjects with a BMI >30 kg/m ²	24.8	42.9	10.1	24.4	24	24	24
Serum creatinine (μmol.L ⁻¹)	76.2 [43 - 205]	76.4 [42 - 139]	70.6 [36 - 171]	75.2 [37 - 114]	71.5 [36 - 205]	71 [36 - 171]	72.7 [43 - 205]
CrCl _{MDRD} (ml.min ⁻¹)	91.5 [28.2 - 198.8]	86.2 [39.2 - 136.2]	89.1 [26.9 - 247.6]	92.4 [46 - 151]	89.9 [26.9 - 247.6]	89.5 [26.9 - 247.6]	91 [28.2 - 200.2]
% subjects CrCl _{MDRD} < 60	8.8	7.5	11.9	12	10.1	9.8	10.8
CrCl _{C&G} formula (ml.min ⁻¹)	87.6 [26.3 - 208.6]	85.3 [34.5 - 163.4]	59.7 [18.6 - 162.6]	91.7 [23 - 200.6]	75 [18.6 - 208.6]	75 [20 - 208.6]	74.2 [18.6 - 200.6]
% patients CrCl _{C&G} < 50 ml/min	10.6	6.4	41.1	12	23.4	22.3	25.9

BW: body weight; CrCl: Creatinine clearance; C&G: Cockcroft & Gault formula; MDRD: simplified Modification of Diet in Renal Disease formula

Model building

A two-compartment model with first-order absorption best described the pharmacokinetics of fondaparinux. The model was parameterised in terms of apparent clearance (Cl/F), apparent

central volume of distribution (V_2/F), apparent peripheral volume of distribution (V_3/F), intercompartmental clearance (Q/F), absorption rate constant (K_a) and a covariance block between Cl/F and V_2/F . Intersubject variabilities were estimated for Cl/F, V_2/F , V_3/F . A combined error (additive and proportional) model provided the best results for residual variability.

During the covariate analysis step, it appeared that fondaparinux clearance was significantly related to creatinine clearance, body weight and age. Creatinine clearance estimated by the simplified MDRD formula was found to be more accurate than the Cockcroft and Gault formula in describing the relationship between renal function and fondaparinux clearance. In addition, a significant correlation was identified with body weight and V_2/F . Inclusion of covariates in the final pharmacokinetic model decreased the objective function from -5003 to -5136; interindividual variabilities in Cl/F and V_2/F , expressed as coefficient of variation, decreased from 51.2% to 43% and 39.5% to 32.8%, respectively. No covariates were discarded during the backward elimination procedure. The final parameter estimates adjusted on the total database are summarised in ► Table 2. The following equations describe the final covariate model for Cl/F and V_2/F .

$$Cl/F = 0.278 \times (WT/68)^{0.534} \times (CrCl/87)^{0.532} \times (Age/74)^{-0.461} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$V_2/F = 8.14 \times (WT/68)^{0.522} \quad (\text{Eq. 5})$$

Derived from these equations, fondaparinux clearance decreased by 25% in subjects with moderate renal impairment ($30 < CrCl_{MDRD} < 60$ ml/min) and by 43% in subjects with severe renal impairment ($CrCl_{MDRD} < 30$ ml/min). It also decreased by 15% in

Table 2: Pharmacokinetic parameters.

Parameters	Value [95% CI]	IIV CV% [95% CI]
K_a (h ⁻¹)	0.716 [0.514 - 0.917]	0 FIX
Cl (L.h ⁻¹) = $\theta_1 \times (WT/68)^{\theta_2} \times (CrCl/87)^{\theta_3} \times (Age/74)^{\theta_4}$		41.8 [37.3 - 45.9]
θ_1	0.278 [0.249 - 0.306]	
θ_2	0.534 [0.37 - 0.697]	
θ_3	0.532 [0.381 - 0.682]	
θ_4	-0.461 [-0.646 - -0.275]	
V_2 (L) = $\theta_5 \times (WT/68)^{\theta_6}$		38.5 [31.5 - 44.4]
θ_5	8.14 [7.7 - 8.57]	
θ_6	0.522 [0.347 - 0.696]	
Q (L.h ⁻¹)	0.082 [0.052 - 0.111]	0 FIX
V_3 (L)	15.6 [-0.7 - 31.9]	239.1 [116.4 - 317.6]
σ^2 additive (mg/l)	0.00123 [0.0008 - 0.0016]	
σ^2 proportional (CV%)	0.0421 [17 - 22]	

[95% CI]: 95% confidence interval of point estimates, σ^2 : residual variance, IIV: inter-individual variability

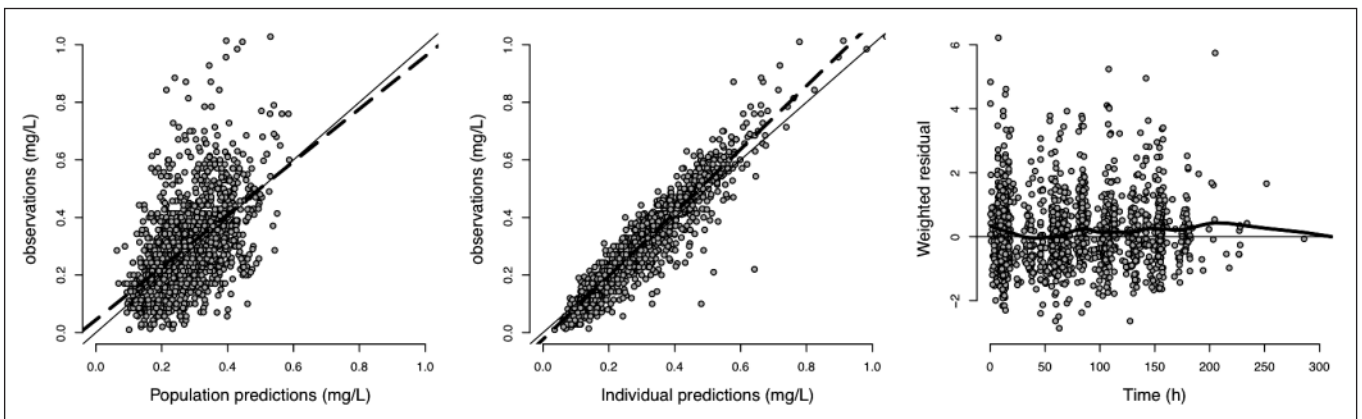


Figure 1: Goodness-of-fit plots. The solid line represents the identity line; the dashed line represents the regression line; the thick curve is the smoothing spline.

subjects with a low body weight (<50 kg) and by 7% in elderly subjects (aged >85 years).

The residual variability of model was low, with a value of 0.001 mg/l for the additive part and a coefficient of variation of 20% for the proportional part.

Model evaluation procedure

Internal validation

Goodness-of-fit plots for the final model are presented in ► Figure 1. The relationships between observed vs. predicted anti-Xa activities and observed vs. individual predictions did not show any apparent bias in the model. Finally no trend was observed for weighted residuals, which were randomly distributed around 0.

The VPC illustrated that the final model adequately described the observed data; the observed pharmacokinetic data were in-

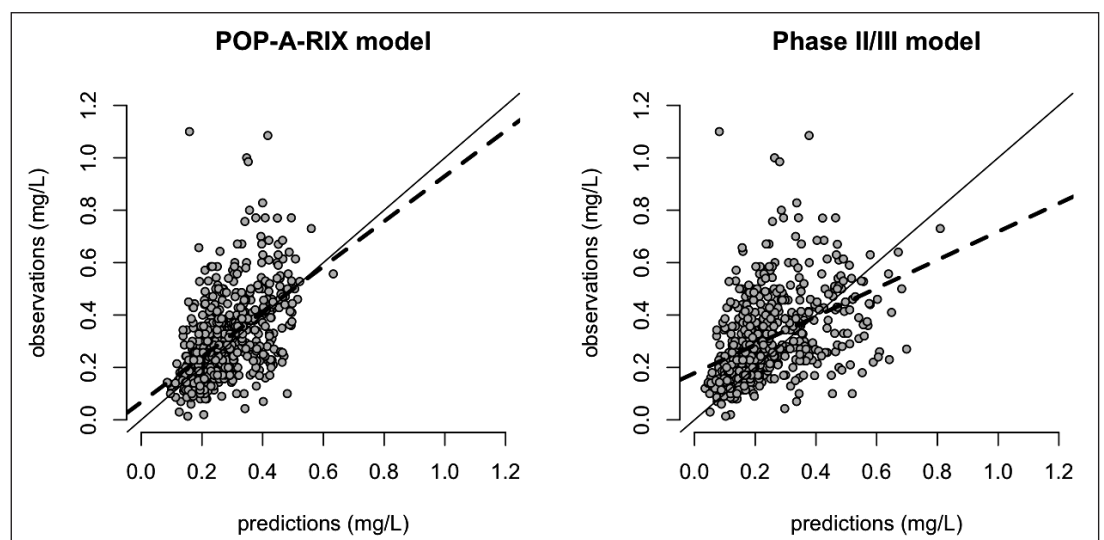
cluded in the 95% envelope of the simulated values from the model, defined by the 2.5 and 97.5 percentiles, indicating the good predictive properties of the model (not shown).

External validation

The final model of mean prediction error showed good predictive performance. The mean prediction error was close to zero (-0.029) and its 95% confidence interval included 0. The precision of the final model was 0.021.

► Figure 2 illustrates the performance of the POP-A-RIX model and the performance of a model previously developed from phase II/III fondaparinux studies, both applied to the validation dataset. The latter model overestimated the higher values of anti-Xa activity and under estimated the lower values observed in our study.

Figure 2: External validation. Comparison of predictions vs. observations for the POP-A-RIX and phase II/III models applied to the validation dataset.



Individual pharmacokinetic parameter estimates

The distribution of Bayesian individual pharmacokinetic parameters was estimated at steady state for C_{max} , C_{min} and half-life. The mean C_{max} was 0.5 [0.19 – 1.16] mg/l, 10% of the patients having a peak concentration above 0.7 mg/l and 2.5% above 0.9 mg/l. The mean C_{min} was 0.29 [0.08 – 0.84] mg/l, 8.2% of the patients showing a trough concentration above 0.4 mg/l. The mean half-life of fondaparinux was 28.9 [12 – 58] h and in 5.8% of the patients, the half-life exceeded 34 h.

Simulations

Simulations using the population pharmacokinetic model, shown in ►Figure 3, were performed to estimate the pharmacokinetic profiles of patients with renal impairment, patients with a low body weight and elderly patients, in comparison to those of patients with normal renal function, those with normal body weight and non-elderly patients, respectively. These simulations revealed that the mean AUC_{d7} , a measure of drug exposure, increased significantly by 34% in patients with renal failure, by 41% in those with a low body weight and by 9% in the elderly population ($p < 0.05$). The mean trough concentration, a measure of drug accumulation in patients, was 56% higher in the renally impaired group, 63% higher in the low body weight group and 16% higher in the elderly. Mean C_{max} was 24%, 29% and 6%, respectively, higher in these three groups.

The relationship between trough concentration and creatinine clearance or body weight was also evaluated by simulations (►Fig. 4). The range of predicted anti-Xa activities on day 7 in patients with renal impaired patients ($Cl_{Cr_{MDRD}} < 60$ ml/min) or low-body-weight patients (< 50 kg) receiving 1.5 mg was comparable to that achieved in patients with normal renal function receiving 2.5 mg. Simulations of concentration-time course for four different subjects are presented in ►Figure 5. The four subjects corresponded to a typical patient undergoing total hip replacement (age 68 years, body weight 75 kg, $CrCl_{MDRD}$ 50 ml/min), a typical patient undergoing knee replacement (age 60 years, body weight 90 kg, $CrCl_{MDRD}$ 100 ml/min), a typical patient undergoing hip fracture surgery (age 90 years, body weight 50 kg, $CrCl_{MDRD}$ 70 ml/min) and receiving 2.5 mg doses of fondaparinux, and the same patient receiving 1.5 mg doses of fondaparinux, respectively.

Discussion

The POP-A-RIX study permitted development of the first population pharmacokinetic model of fondaparinux, administered at prophylactic doses, based on a large prospective cohort of unselected patients in clinical practice. The baseline characteristics of the 809 patients included were similar to those observed in observational studies in major orthopaedic surgery, indicating that the sample was an adequate representation of patients in everyday practice (8, 9). Furthermore, the wide range of demographic factors permitted evaluation of their influence on the pharmacokinetics of fondaparinux.

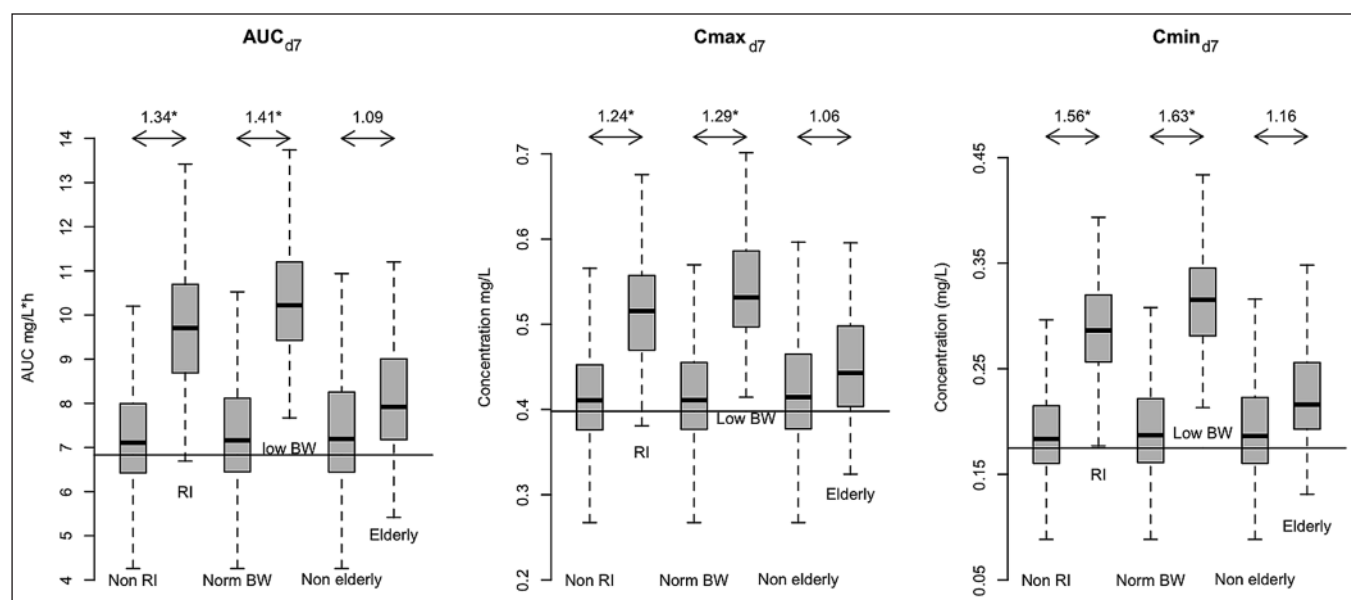


Figure 3: Predicted drug exposure to seven-day treatment with fondaparinux. Simulated AUC_{d7} , $C_{max_{d7}}$ and $C_{min_{d7}}$ after seven 2.5 mg doses of fondaparinux. The boxplots portray the median and the 25th and 75th percentiles (boxes), as well as the lower and upper limits of the normal distribution. RI denotes patients with renal impairment ($CrCl_{MDRD} < 60$ ml/min); BW

signifies body weight; low BW indicates the group of patients with BW < 50 kg; The "Elderly" group comprises patients aged > 85 years. The arrows indicate the geometric mean difference between two groups. * signifies a statistically significant difference between two groups.

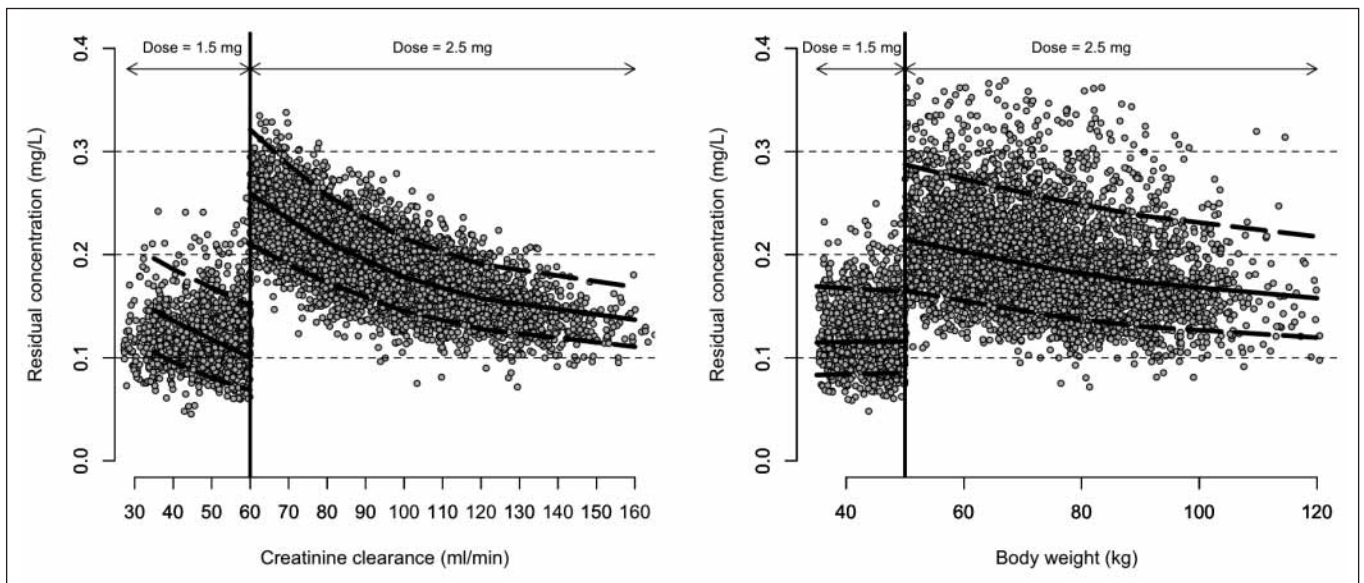


Figure 4: Individual predicted residual concentration. Individual predicted residual concentration on day 7 in patients with a $\text{CrCl}_{\text{MDRD}}$ between 30 and 60 ml/min, or a body weight between 35 and 50 kg, receiving 1.5 mg of fondaparinux once daily and in patients with creatinine clearance of 60 ml/min or more or with a body weight of 50 kg or more receiving 2.5 mg of fondaparinux once daily.

A two-compartment model with first-order absorption best described the pharmacokinetics of fondaparinux. The covariates found to explain in part the inter-individual variability were body weight, age and creatinine clearance estimated by simplified MDRD formula. The relationship between renal function and the fondaparinux pharmacokinetics was to be expected as this compound is mainly excreted by the kidneys in unchanged form (3). In our model, fondaparinux clearance was decreased by 25% in patients with moderate renal impairment ($\text{CrCl}_{\text{MDRD}} \leq 60$ ml/min) and by 43% in those with severe renal impairment ($\text{CrCl}_{\text{MDRD}} \leq 30$ ml/min). It is important to note that renal insufficiency determined on the basis of the simplified MDRD formula rather than the Cockcroft-Gault formula better explained the variability of fondaparinux clearance in this population, probably because our study included many elderly patients (Table 1) (23). A similar observation was reported in a pharmacokinetic study of enoxaparin performed in patients above 75 years old (24). The second covariate related to inter-individual variability was body weight. In patients weighing less than 50 kg, fondaparinux clearance was decreased by 15% and the volume of distribution was decreased by 15%.

Various evaluation procedures indicated that the observed data were well described by our model. Furthermore, our model better described the observed data than the previously reported model based on data from phase II/III studies on fondaparinux (4). As illustrated by the Goodness-of-fit plots, the latter model overestimated the higher values of anti-Xa activity and underestimated the lower values observed in our study (Fig. 2). The reasons for this discrepancy between the two models are unclear. They could be due to differences in the baseline characteristics of the patients forming the basis for developing the models: the restricted distribution of

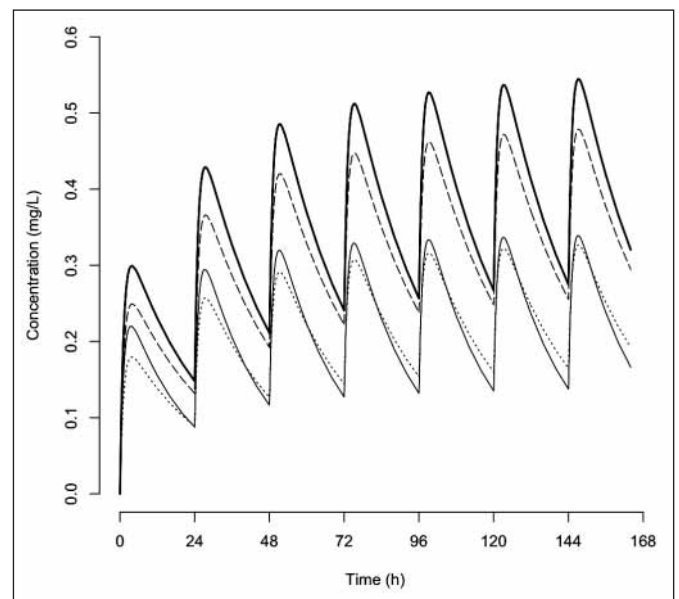


Figure 5: Simulations of the time course of fondaparinux concentrations for four patients. The dashed line represents a typical patient undergoing total hip replacement (age 68 years, body weight 75 kg, $\text{CrCl}_{\text{MDRD}}$ 50 ml/min); the solid line denotes a typical patient undergoing knee replacement (age 60 years, body weight 90 kg, $\text{CrCl}_{\text{MDRD}}$ 100 ml/min); the thick solid line indicates a typical patient undergoing hip fracture surgery (age 90 years, body weight 50 kg, $\text{CrCl}_{\text{MDRD}}$ 70 ml/min) with 2.5 mg of fondaparinux; the dotted line represents a typical patient undergoing hip fracture surgery treated with the new dosage regimen comprising 1.5 mg of fondaparinux once daily.

What is known about this topic?

- Little is known about fondaparinux population pharmacokinetics.
- Data available are based on highly selected patient populations included in phase II/III trials.

What does this paper add?

- Body weight, age and renal clearance influenced fondaparinux pharmacokinetics.
- Creatinine clearance estimated by the simplified MDRD formula was found to be more accurate than the Cockcroft and Gault formula in describing the relationship between renal function and fondaparinux clearance.
- Our results suggest that fondaparinux pharmacokinetics need to be confirmed in patient populations not fully assessed in phase II/III studies.

age and body weight in phase II/III trials would not allow detection of any relationship between these factors and pharmacokinetic parameters even if such a relationship exists. The discrepancy could also be due to differences in the covariates implemented in the two models. In particular, the previous pharmacokinetic model found that clearance of fondaparinux was only related to creatinine clearance when this was estimated using the Cockcroft-Gault formula, because this directly introduces a correlation with demographic characteristics. In our model, use of the simplified MDRD formula to estimate creatinine clearance avoided any correlation with other variables and probably allowed us to detect the individual impact of other covariates affecting clearance of the drug, such as body weight and age. Whatever the reasons for the discrepancy, our results question the validity of population pharmacokinetic modeling based on data from randomised studies to adequately predict pharmacokinetics in special populations encountered in everyday practice.

Pharmacokinetic simulations were performed to study the influence of renal clearance, weight and age on the potential accumulation of a fixed dose of 2.5 mg fondaparinux once a day. On day 7, predicted AUC_{d7} , $C_{max_{d7}}$ and $C_{min_{d7}}$ values were approximately 25 to 56% higher in patients with moderate renal impairment or low body weight than in patients with normal renal function or a body weight above 50 kg. However, no significant difference was observed with regard to age. This was to be expected, as age has only a moderate effect on fondaparinux clearance. These simulations suggest that a fixed prophylactic dose of fondaparinux 2.5 mg in patients with renal impairment or low body weight will lead to accumulation. This may explain in part the increased risk of major bleeding observed in this latter population in the thromboprophylactic trials in major orthopaedic surgery. Furthermore, the slight increase in major bleeding with age observed in the clinical studies on fondaparinux at prophylactic doses does not contradict our findings. Fondaparinux may accumulate in elderly patients because both renal function and body weight decline with age.

In order to reduce drug exposure, two approaches may be proposed. One is to increase the interval between doses of the drug; the

other, probably more practical, is to reduce the dose administered. The pharmacokinetic simulations performed in this study showed that the greatest discrepancy between exposure parameters was observed for the trough concentrations (C_{min}). This parameter is believed to be an index of drug accumulation. A pharmacokinetic simulation of C_{min} according to renal clearance and weight was therefore performed. The results showed that the predicted C_{min} values on day 7 in patients with moderate renal impairment or low body weight receiving 1.5 mg of fondaparinux were lower than the predicted C_{min} values in patients with normal renal function and body weight receiving 2.5 mg (Fig. 4). Furthermore, the predicted drug exposure after a dose of 1.5 mg in an elderly patient with mild renal impairment and low body weight may be similar to the predicted exposure after a dose of fondaparinux 2.5 mg in a "normal" patient (Fig. 5). These findings suggest that dose adjustment of fondaparinux to provide similar levels of drug exposure in a wide range of patients may not be as straightforward as the dose adjustment rules recommended by regulatory authorities (25).

In conclusion, this population study showed that body weight, age and renal clearance influenced fondaparinux pharmacokinetics. A body weight less than 50 kg and moderate renal failure increased drug exposure. Yet, a statistically significant increase in drug exposure does not necessarily signify a clinically relevant effect. Before recommending dose adjustment, the relationship between drug accumulation and bleeding needs to be confirmed in the first instance. Second, it should be demonstrated that a lower exposure improves the safety of the drug in terms of bleeding risk while having no significant impact on efficacy.

Acknowledgements

The POP-A-RIX study has received funding support from the Ministère de la Santé-France- Programme Hospitalier de Recherche Clinique and was promoted by the University Hospital of Saint Etienne. The study was also supported by a grant from Féd-

Appendix**The GETHCAM study group**

A. Sautet, C. Vielpeau, Ph. Nguyen, J.Y. Borg, J. Barré, M.T. Barrelier, S. Laport, P. Mismetti, N. Rosencher, M.M. Samama, C.M. Samama, P. Zufferey.

POP-A-RIX study group

Sponsor: University Hospital of Saint Etienne. **Coordinating centre:** X. Delavenne, B. Deygas, C. Labruiere, S. Laporte, P. Mismetti, E. Presles, P. Zufferey. **Central adjudication committee:** A. Buchmuller, P. Mismetti. **Data management:** C. Bernabe. **Statistical analysis:** E. Presles. **Investigators** (in order of the number of patient enrolled) – (997 patients total): P. Martin – P. Zufferey, B. Tardy – M. Piot, CHU de Saint-Etienne (331); D. Baylot, B. Tardy – B. Melley, Clinique Mutualiste de Saint-Etienne (313); J. Barré, Ph. Nguyen, CHU de Reims (153), F. Charret, E. Forrestier, Clinique des Cévennes – Annonay (93); N. Rosencher, M. Fontenay, M. Fontenay APHP – Cochin (40); S. Lignot, J.Y. Borg, CHU de Rouen (36); P.Y. Petit, D. Massignon, Centre Hospitalier Lyon Sud (19); M. Pegoux, A. Lequerrec, CHU de Caen (12).

ération Hospitalière de France, Leem “Année Recherche Clinique” 2006. The first author has received the prize “jeune chercheur” from the “Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique » 2009.

References

- Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, et al. American College of Chest Physicians. Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133: 381–453.
- Turpie A, Bauer K, Eriksson B, et al.; Steering Committees of the Pentasaccharide Orthopedic Prophylaxis Studies. Efficacy and safety of fondaparinux in major orthopedic surgery according to the timing of its first administration. *Thromb Haemost* 2003; 90: 364–366.
- Donat F, Duret JP, Santoni A, et al. The pharmacokinetics of fondaparinux sodium in healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 1–9.
- Turpie AG, Lensing AW, Fujii T, et al. Pharmacokinetic and clinical data supporting the use of fondaparinux 1.5 mg once daily in the prevention of venous thromboembolism in renally impaired patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20: 114–121.
- Eriksson BI, Bauer KA, Lassen MR, et al. Steering Committee of the Pentasaccharide in Hip-Fracture Surgery Study. Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after hip-fracture surgery. *N Engl J Med* 2001; 345: 1298–1304.
- Turpie AG, Gallus AS, Hoek JA. Pentasaccharide Investigators. A synthetic pentasaccharide for the prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement. *N Engl J Med* 2001; 344: 619–625.
- Turpie AG, Bauer KA, Eriksson BI, et al. PENTATHALON 2000 Study Steering Committee. Postoperative fondaparinux versus postoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind trial. *Lancet* 2002; 359: 1721–1726.
- Rosencher N, Vielpeau C, Emmerich J, et al. ESCORTE group. Venous thromboembolism and mortality after hip fracture surgery: the ESCORTE study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2006–2014.
- Samama CM, Ravaud P, Parent F, et al. Epidemiology of venous thromboembolism after lower limb arthroplasty: the FOTO study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2360–2367.
- Mueck W, Borris LC, Dahl OE, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of once- and twice-daily rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. *Thromb Haemost* 2008; 100: 453–461.
- Ufer M. Comparative efficacy and safety of the novel oral anticoagulants dabigatran, rivaroxaban and apixaban in preclinical and clinical development. *Thromb Haemost* 2010; 103: 572–585.
- Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31–41.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461–470.
- Laroche L, Charmes JP, Marcheix A, et al. Estimation of glomerular filtration rate in the elderly: Cockcroft–Gault formula versus modification of diet in renal disease formula. *Pharmacother* 2006; 26: 1041–1046.
- Bara L, Planes A, Samama MM. Occurrence of thrombosis and haemorrhage, relationship with anti-Xa, anti-IIa activities, and D-dimer plasma levels in patients receiving a low molecular weight heparin, enoxaparin or tinzaparin, to prevent deep vein thrombosis after hip surgery. *Br J Haematol* 1999; 104: 230–240.
- Beal SL, Sheiner LB. Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng* 1982; 8: 195–222.
- Sheiner LB, Grasela TH. An introduction to mixed effect modelling: concepts, definitions and justification. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991; 19: 11–24.
- Wählby U, Jonsson EN, Karlsson MO. Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001; 28: 231–252.
- Jadhav PR, Gobburu JV. A new equivalence based metric for predictive check to qualify mixed-effects models. *AAPS J* 2005; 7: 523–523.
- Brendel K, Dartois C, Comets E, et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 221–234.
- Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9: 503–512.
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 1–266.
- Fehrman-Ekholm I, Skeppholm L. Renal function in the elderly (>70 years old) measured by means of iothexol clearance, serum creatinine, serum urea and estimated clearance. *Scand J Urol Nephrol* 2004; 38: 73–77.
- Berges A, Laporte S, Epinat M, et al. Anti-factor Xa activity of enoxaparin administered at prophylactic dosage to patients over 75 years old. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64: 428–438.
- Arixtra. Fondaparinux sodium. Summary of product characteristics. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Available from URL: <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/arixtra/011502en6.pdf>. Accessed January 15, 2010.

Xavier Delavenne^{1,2}
Thierry Basset^{1,2}
Paul Zufferey^{2,3}
Nora Malouk²
Silvy Laporte^{2,4,5}
Patrick Mismetti^{2,4}

¹Laboratory of Pharmacology and Toxicology, University Hospital, Saint-Etienne, France

²Thrombosis Research Group (EA 3065), University Jean Monnet, Saint-Etienne, France

³Anesthesiology and Intensive Care Department, University Hospital, Saint-Etienne, France

⁴Clinical Pharmacology Department, University Hospital, Saint-Etienne, France

⁵Inserm, CIE3, Saint-Etienne, France

Short Communication

Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel active metabolite

A sensible ultra-performance LC–MS method was developed and validated for the quantification of clopidogrel active metabolite in human plasma, with clopidogrel D4 as internal standard. Plasma pretreatment involved a one-step protein precipitation with acetonitrile. The separation was performed by reverse-phase chromatography on a C8 column. The method was linear over the concentration range of 1–150 ng/mL. The intra- and inter-day precision values were below 17% and accuracy was from 1.7 to 7.5% at all quality control levels. The lower LOQ was 0.8 ng/mL. Sample analysis time was reduced to 5 min including sample preparation (limited to protein precipitation). The present method was successfully applied to a clopidogrel active metabolite pharmacokinetic study following oral administration to healthy volunteers.

Keywords: Clopidogrel / Metabolite / Pharmacokinetics / Ultra-performance LC-MS/MS

DOI 10.1002/jssc.201000115

Received February 18, 2010

Revised April 13, 2010

Accepted April 14, 2010

1 Introduction

Clopidogrel is an oral antiplatelet drug that inhibits the P2Y₁₂ adenosine diphosphate receptor [1]. Clopidogrel is indicated for the reduction of ischemic events in patients with recent stroke, myocardial infarction or established peripheral arterial disease. Clopidogrel is a prodrug that requires hepatic biotransformation to produce the platelet anti-aggregating effect. Clopidogrel is primarily metabolized into an inactive 2-oxoclopidogrel and then into the pharmacologically active metabolite (clopidogrel active metabolite, CAM). This oxidation process is mediated by cytochrome P450 (Fig. 1) [1, 2].

A variety of methods have been published for the determination of clopidogrel and its major carboxylic acid metabolite [3–13]. These methods focus on pharmacologically inactive forms of clopidogrel and present little interest in evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics relationship. Taubert *et al.* used clopidogrel to establish calibration curve and quantify CAM with LC MS/MS after

undocumented protein precipitation [14]. In this article, only CAM was approximated. Takahashi *et al.* developed the only validated method for the quantification of CAM in human plasma with LC MS/MS after solid-phase extraction [15]. In this method, the authors demonstrated that the stabilization of CAM was an essential step. The method had a good sensibility with a lower LOQ (LLOQ) of 0.5 ng/mL. In their study, time-consuming solid-phase extraction was used for sample pretreatment. In addition, the total run time was 6 min and was not suitable for high-throughput analysis.

We present here, the development and validation of a rapid and simple method for the CAM quantification by ultra-performance LC (UPLC) MS/MS. After validation, the method was applied to CAM pharmacokinetic study in healthy volunteers.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Racemic clopidogrel active metabolite derivatized (CAMD) (98% purity, HPLC-MS) was synthesized by Alsachim (Strasbourg, France). Clopidogrel-D4 was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). The alkylating agent 2-bromo-3'-methoxyacetophenone (MPB) was obtained from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Working solutions containing all the reference substances to be analyzed were prepared at concentrations of 1 mg/L in acetonitrile from Carlo Erba (Val de Reuil, France)/distilled water from Aguetant (Lyon, France) (80/20%) for tuning

Correspondence: Dr. Xavier Delavenne, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, University Hospital, F-42055 Saint-Etienne, France

E-mail: xavier.delavenne@chu-st-etienne.fr

Fax: +33-4-7712-7820

Abbreviations: CAM, clopidogrel active metabolite; CAMD, clopidogrel active metabolite derivatized; IS, internal standard; LLOQ, lower LOQ; MPB, 2-bromo-3'-methoxyacetophenone; MRM, multiple-reaction monitoring; QC, quality control; UPLC, ultra-performance LC

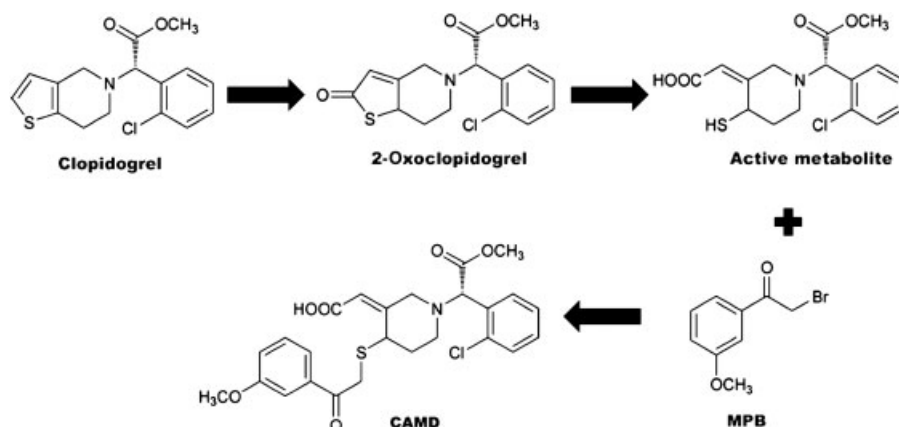


Figure 1. Metabolic pathway of clopidogrel followed by stabilization with MPB in CAMD.

studies, and stored at -20°C . Working solutions of CAMD at 1 g/L in acetonitrile were used for the preparation of calibrators and quality control (QC) samples. Calibration standards and QC were prepared by serial dilution of the working solution in blank plasma, Medidrug Baseline S Medichem (Steinenbronn, Germany), resulting in six individual concentrations from 1 to 150 ng/mL for CAMD calibrators and 1, 20 and 100 ng/mL for QC. Calibration curves and QC samples were prepared from separate working solutions. Analytical grade formic acid was obtained from Sigma. Internal standard (IS) solution was prepared at a concentration of 30 ng/mL by diluting clopidogrel-D4 in acetonitrile. Mobile phases were filtered through a 0.2 μm polyvinylidene fluoride filter provided by Interchim (Montluçon, France).

2.2 Sample preparation

Blood samples were collected in 5 mL test tubes containing EDTA. Immediately after drawing, 25 μL of 500 mM MPB in acetonitrile was directly added to each whole blood sample to ensure derivatization of CAM to CAMD (Fig. 1). This method was previously described to allow CAM stabilization [13]. The blood samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min and the plasma samples stored at -80°C until analysis. Two hundred microliters of plasma, calibrator or QC were combined with 400 μL of IS working solution for protein precipitation. The mixture was vortexed and centrifuged at 12 000 rpm for 4 min. Then 10 μL of the supernatant was injected into the UPLC system.

2.3 Ultra-performance LC–MS/MS

An Acquity ultra-performance LC system coupled to a Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer from Waters (Saint-Quentin en Yvelines, France) was used. Different analytic columns were tested for retention, peak shape and retention time stability: Luna C18 Mercury MS

20 mm \times 4 mm \times 3.5 μm (Phenomenex, Fresnes, France), BEH C18 50 mm \times 2.1 mm \times 1.7 μm (Waters) and BEH C8 100 mm \times 1 mm \times 1.7 μm (Waters). Chromatographic separation was performed at 40°C . The mobile phase was a mix of A: distilled water containing 0.1% formic acid and B: acetonitrile containing 0.1% formic acid. The gradient was: 0–0.1 min, 50% B; 0.1–0.5 min: linear from 50 to 90% B; 0.5–1.5 min: 90% B; 1.51 min return to initial conditions. Mobile phase flow was set to 0.2 mL/min and injected volume was 10 μL . Positive electrospray ionization mode was used. Acquisition was performed in multiple-reaction monitoring (MRM) mode and the protonated molecular ion of each compound was chosen as precursor ion. Mass spectrometer parameters were as follows: capillary voltage, 1.5 kV; lens voltage, 0.3 V; source temperature, 140°C ; desolvatation temperature, 400°C ; cone gas flow 50 L/h; desolvatation gas flow, 650 L/h. Dry nitrogen ($\geq 99.5\%$) produced by N_2 generator F-DBS (Courtaboeuf, France) was used as desolvatation and nebulization gas and argon ($> 99.999\%$, Mecer, France) was used as collision gas. Cone voltage, collision energy, parent and daughter masses were optimized by direct introduction of CAMD and IS solutions in the mass spectrometer at a concentration of 1 mg/L in acetonitrile. Interchannel and interscan delay were 0.01 and 0.02 s. Data acquisition was performed in MRM. All data were acquired and processed using MassLynx v 4.1 software (Waters).

2.4 Quantification and method validation

CAMD was quantified using clopidogrel-D4 as an IS; area ratio was used for calculation. Calibration samples were prepared by serial dilution of CAMD working solution in blank plasma resulting in individual concentrations of 1, 5, 25, 50, 100 and 150 ng/mL to ensure complete cover of the therapeutic concentration observed with this drug. A fixed concentration of clopidogrel-D4 (IS) was added to all calibration points. To evaluate linearity, six sets of plasma calibration curves were prepared and assayed. Intra-day and

inter-day precisions were determined by the analysis of spiked QC samples at 1, 20 and 100 ng/mL ten times during the same day and on six different days. The method accuracy was determined by analyzing the three-level QC samples ten times. The precision was calculated as the RSD and the accuracy was expressed as the relative error *versus* theoretical concentration. Lower LOD and LLOQ were determined by extraction and injection of decreasing amounts of CAMD in plasma samples and were calculated as the concentration giving peaks with a signal-to-noise ratio of 3 and 10 respectively. Carryover was tested by the analysis of high-concentration spiked plasma (400 ng/mL) followed by five blank samples. Specificity was evaluated by the analysis of eight different blank batches of plasma. The matrix effect was evaluated by comparing the peak height ratio of CAMD and IS in neat standard solutions and post-extraction control plasma spiked at three QC levels (1, 20 and 100 ng/mL) in eight different plasma.

2.5 Pharmacokinetic analysis

The developed method was used to determine CAM plasma concentration in pharmacokinetic study. The study was performed in accordance with the principles of the *Declaration of Helsinki* and approved by the Ethics Committee of Rhône-Alpes Loire. Eight healthy male volunteers gave written informed consent and were enrolled in the study. Nine EDTA blood samples were collected at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 and 10 h after a single 600 mg dose of clopidogrel. Pharmacokinetic parameters were calculated by a non-compartmental analysis using the total area under the plasma concentration–time curve from time zero to infinity ($AUC_{0-\infty}$) with R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The peak plasma concentration (C_{max}) and time to reach C_{max} (T_{max}) were read directly from the experimental data. Half-life ($t_{1/2}$) was calculated by the equation $t_{1/2} = \ln 2 / k_{el}$ where k_{el} was estimated from the slope of the terminal phase of the logarithmic plasma concentration–time curve using at least three points.

3 Results and discussion

3.1 Ultra-performance LC

According to CAMD producer recommendations, acetonitrile-based mobile phase was preferred for CAMD stability. Retention, peak shape and retention time stability of both CAMD and IS were excellent on every column tested under similar mobile-phase gradient. To improve sensibility and allow analysis of residual levels expected in PK analysis, the BEH C8 column was chosen. The low mobile-phase flow (0.2 mL/min) limited the dilution of CAMD chromatographic peak and allowed low solvent requirement. Under these conditions, the full method analysis time was 1.5 min. Figure 2 shows chromatograms of pre-dose, LLOQ and PK study samples. It is interesting to note here that CAMD in calibrators and QC samples show a double peak partially resolved. The synthesis process that leads to two isomers of CAMD explained this. The double peak was integrated and processed for both calibrator and QC samples. Enantioselective metabolism of clopidogrel to CAM did not lead to multiple diastereoisomers explaining why PK study samples did not show this peak shape for CAMD.

3.2 MS

Optimized values for each compound are listed in Table 1. In order to improve sensibility, mass resolutions of both quadrupoles were set to the minimum value (12.5 arbitrary unit) with respect of specificity.

Table 1. MS/MS parameters

	Transition	Cone voltage (eV)	Collision energy (V)	Dwell time (s)
CAMD	504.2 > 155	20	15	0.385
Clopidogrel D4	326.2 > 216	30	40	0.385

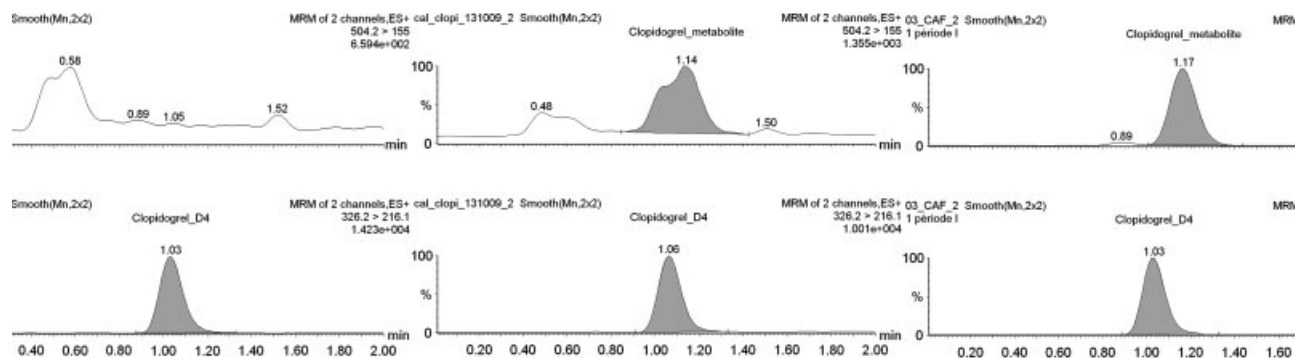
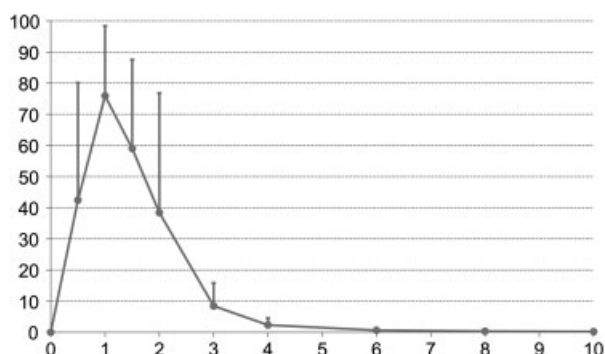


Figure 2. Pre-dose, LOQ and pharmacokinetics study samples chromatograms of CAM.

Table 2. Intra- and inter-day accuracy and precision for CAM

		Precision, RSD (%)		Accuracy, RE (%)
		Intra-day (<i>n</i> = 10)	Inter-day (<i>n</i> = 6)	
Low concentration	1 ng/mL	12.0	10.2	3.8
Middle concentration	20 ng/mL	12.0	9.5	7.5
High concentration	100 ng/mL	1.0	5.7	1.7

RE, relative error.

**Figure 3.** Mean plasma CAMD concentrations from 0 to 10 h after a 600 mg single dose of clopidogrel (*n* = 8).

3.3 Method validation

According to the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency guidances, the successfully validated method underwent a partial validation procedure. A linear regression with $1/x$ weighting provided the best fitting of calibration curve to experimental points. Typical equation of the calibration curves were $y = 0.096x + 0.014$ where y represents the ratio of the CAM peak area to that of the IS and x represents the plasma concentration. The mean correlation coefficient during the validation was $r = 0.998$ ($n = 6$). Precision and accuracy data are summarized in table 2. Recovery was not tested because there was no extraction process in the method. LOD was 0.3 ng/mL. LLOQ was 0.8 ng/mL but was rounded to 1 ng/mL for convenience in calibrators manufacturing. No interference was detected on CAMD or IS MRM for the eight blank plasma tested. No carryover was observed after analysis of high CAMD sample. The peak height ratios of CAMD and IS at three QC levels (1, 20 and 100 ng/mL) compared with neat standard solutions ranged from 98 to 104% ($n = 24$), no matrix effect was observed. Takahashi *et al.* tested CAM derivatization yield and CAMD stability in plasma samples and working solutions [15].

3.4 Pharmacokinetic analysis

This method was successfully applied to the pharmacokinetic study of CAM after administration of a 600 mg single dose of clopidogrel to eight healthy male volunteers. Results in Fig. 3 show mean plasma concentrations of CAM in this

study. The pharmacokinetic parameters for CAM are $AUC_{0-\infty}$ 131.5 ± 59.2 ng/mL*h; C_{max} 82.6 ± 30.9 ng/mL; T_{max} 1 h (median); $t_{1/2}$ 0.4 ± 0.1 h. In the previously published studies using a similar quantification step, Brandt *et al.* reported $AUC_{0-\infty}$ 43.8 ng/mL*h and C_{max} geometric mean 35.9 ng/mL after 300 mg clopidogrel loading dose in healthy volunteer [16]. Wallentin *et al.* described $AUC_{0-\infty}$ 85.2 ng/mL*h after 600 mg clopidogrel loading dose in patients with coronary artery disease [17]. Our data are comparable to the previously published. We observed a slight increase in $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} probably due to the difference of populations studied.

4 Concluding remarks

We described development and validation of a rapid, high-throughput sensible and accurate UPLC method using MS/MS detection for CAM concentration determination in human plasma. The method was able to accurately quantify CAM down to 1 ng/mL in human plasma with a run time of only 1.5 min. The improvement of MS detection allowed us to limit sample preparation to protein precipitation in order to reach a global analysis time of less than 5 min. After validation, it was successfully applied to a pharmacokinetic study.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Savi, P., Combalbert, J., Gaich, C., Rouchon, M. C., Maffrand, J. P., Berger, Y., Herbert, J. M., *Thromb. Haemost.* 1994, 72, 313–317.
- [2] Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P. B., *Nature* 2001, 409, 202–207.
- [3] Bahrami, G., Mohammadi, B., Sisakhtnezhad, S., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008, 864, 168–172.
- [4] Mani, H., Toennes, S. W., Linnemann, B., Urbanek, D. A., Schwonberg, J., Kauert, G. F., Lindhoff-Last, E., *Ther. Drug. Monit.* 2008, 30, 84–89.
- [5] Robinson, A., Hillis, J., Neal, C., Leary, A. C., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, 848, 344–354.

- [6] Shin, B. S., Yoo, S. D., *Biomed. Chromatogr.* 2007, 21, 883–889.
- [7] Nirogi, R. V., Kandikere, V. N., Shukla, M., Mudigonda, K., Maurya, S., Boosi, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 1695–1700.
- [8] Sourì, E., Jalalizadeh, H., Kebriaee-Zadeh, A., Shekarchi, M., Dalvandi, A., *Biomed. Chromatogr.* 2006, 20, 1309–1314.
- [9] Ksycinska, H., Rudzki, P., Bukowska-Kiliszek, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 533–539.
- [10] Lainesse, A., Ozalp, Y., Wong, H., Alpan, R. S., *Arzneimittelforschung* 2004, 54, 600–604.
- [11] Lagorce, P., Perez, Y., Ortiz, J., Necciari, J., Bressolle, F., *J. Chromatogr. B* 1998, 720, 107–117.
- [12] Pereillo, J. M., Maftouh, M., Andrieu, A., Uzabiaga, M. F., Fedeli, O., Savi, P., Pascal, M., Herbert, J. M., Maffrand, J. P., Picard, C., *Drug Metab. Dispos.* 2002, 30, 1288–1295.
- [13] Patel, N. K., Subbaiah, G., Shah, H., Kundlik, M., Shrivastav, P. S., *J. Chromatogr. Sci.* 2008, 46, 867–875.
- [14] Taubert, D., Kastrati, A., Harlfinger, S., Gorchakova, O., Lazar, A., von Beckerath, N., Schömig, A., Schömig, E., *Thromb. Haemost.* 2004, 92, 311–316.
- [15] Takahashi, M., Pang, H., Kawabata, K., Farid, N. A., Kurihara, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 1219–1224.
- [16] Brandt, J. T., Payne, C. D., Wiviott, S. D., Weerakkody, G., Farid, N. A., Small, D. S., Jakubowski, J. A., Naganuma, H., Winters, K., *J. Am. Heart J.* 2007, 153, 66. e9–e16.
- [17] Wallentin, L., Varenhorst, C., James, S., Erlinge, D., Braun, O. O., Jakubowski, J. A., Sugidachi, A., Winters, K. J., Siegbahn, A., *Eur. Heart J.* 2008, 29, 21–30.

moderate P2Y₁₂ receptor defects, but is unable to identify patients with heterozygous defects of the receptor. Our results might also be relevant to the use of the VASP phosphorylation assay for monitoring individual response to clopidogrel, which has been recommended for identifying patients who are poor responders to the drug [2]. The VASP phosphorylation assay has been used for this purpose in many studies [10,11], but the cut-off value for the identification of patients who are poor responders or resistant to the drug has not been clearly identified yet. From our observation that the assay is insensitive to mild defects of P2Y₁₂, it can be concluded that clopidogrel-treated patients who display a normal PRI with the VASP phosphorylation assay should also not be considered resistant to clopidogrel, because they may have a high percentage of their platelet receptors inhibited by the drug.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1628–36.
- Cattaneo M. New P2Y₁₂ inhibitors. *Circulation* 2010; **121**: 171–9.
- Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM, McGregor JL, Mannucci PM. Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood* 1992; **80**: 2787–96.
- Gachet C, Cattaneo M, Ohlmann P, Hechler B, Lecchi A, Chevalier J, Cassel D, Mannucci PM, Cazenave JP. Purinoceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. *Br J Haematol* 1995; **9**: 434–44.
- Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert JM, Maffrand JP, Nurden A. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb–IIIa complex function. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1612–22.
- Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A₂ production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet ‘primary secretion defect’ are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: E101–6.
- Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Impaired platelet function in a patients with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 2315–23.
- Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, Ware J, Ruggeri ZM. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 1978–83.
- Waldmann R, Nieberding M, Walter U. Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem* 1987; **167**: 441–8.
- Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets – definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1145–52.
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 85–92.

Is there really a relationship between the plasma concentration of the active metabolite of clopidogrel and the results of platelet function tests?

X. DELAVENNE,*†‡ N. MALLOUK,†‡ M. PIOT,†‡ P. MISMETTI†‡§ and S. LAPORTE†‡§

*Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne; †Université de Lyon, Saint-Etienne; ‡Groupe de Recherche sur la Thrombose, Université de Saint-Etienne, Jean Monnet, Saint-Etienne; and §Unité de Recherche Clinique Innovation et Pharmacologie, CHU de Saint-Etienne, Saint Etienne, France

To cite this article: Delavenne X, Mallouk N, Piot M, Mismetti P, Laporte S. Is there really a relationship between the plasma concentration of the active metabolite of clopidogrel and the results of platelet function tests? *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2334–8.

Correspondence: Xavier Delavenne, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, University Hospital, F-42055 Saint-Etienne, France.
Tel.: +33 4 7712 0572; fax: +33 4 7712 7820.
E-mail: xavier.delavenne@chu-stetienne.fr

DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04004.x

Received 21 May 2010, accepted 23 July 2010

Clopidogrel is the standard antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndrome or undergoing percutaneous coronary intervention [1–3]. To exert its effect, clopidogrel has to be converted into an active metabolite by hepatic cytochrome P450 (CYP) isoenzymes [4]. This metabolite subsequently inhibits ADP-stimulated platelet activation and aggregation by irreversibly binding to platelet P2Y₁₂ receptors.

In clinical practice, the pharmacodynamic response to clopidogrel is variable, 20–30% of patients showing a low response to clopidogrel, in terms of inhibition of ADP-induced platelet aggregation [5,6]. Furthermore, such 'low responders' have a poorer clinical outcome after an acute coronary syndrome or percutaneous coronary intervention than patients not 'resistant' to clopidogrel [6,7]. The low responsiveness to clopidogrel appears to result from low exposure to its active metabolite [8–11], and an adequate level of platelet inhibition may be achieved in 'low-responder' patients by increasing the clopidogrel dose [12,13]. However, although laboratory tests could be valuable in clinical practice, the complexity of the mechanisms underlying this characteristic has so far precluded the establishment of any approach for routinely distinguishing 'low responders'.

The variability in the responsiveness to clopidogrel involves both genetic and pharmacologic factors [14]. Thus, polymorphism of the CYP 2C19 genotype is an important determinant of responsiveness to clopidogrel and subsequent cardiovascular events [4,15,16]; consequently, the US Food and Drug Administration has recently changed the prescribing information for clopidogrel to highlight this point [17,18]. However, the CYP 2C19 genotype is not the sole determinant of response to clopidogrel; other factors, such as body weight, variations in absorption of the drug, drug interactions and variations in platelet P2Y₁₂ receptors, should also be taken into consideration [15,19,20]. By providing a better reflection of *in vivo* plasma levels of the active metabolite of clopidogrel, platelet function tests may therefore represent a more appropriate means of assessing overall response to clopidogrel. Therefore, we performed a pharmacokinetic and pharmacodynamic study in healthy volunteers to investigate the relationship between the plasma concentrations of the active metabolite of clopidogrel and the results of various platelet function tests used in routine practice.

The study population comprised eight healthy male Caucasian volunteers (18–35 years of age, 55–85 kg). This was an open-label study, in which each subject received a single 600-mg loading dose of clopidogrel orally (Plavix 75 mg; Sanofi Pharma Bristol-Myers Squibb SNC, Paris, France). Blood was collected before and 1, 2, 4, 6 and 8 h after clopidogrel administration. All subjects gave written informed consent to the protocol, which was approved by the local Ethics Committee (Rhône-Alpes Loire, France). The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Platelet aggregation was measured by light transmittance aggregometry (TA-4V aggregometer; Sd-Medical, Heillecourt, France). Platelet-rich plasma was prepared from citrate-anticoagulated blood by centrifugation (150 × g, 10 min), and maximum platelet aggregation (MPA), induced by 5 and 10 µmol L⁻¹ ADP (final concentration), was measured. Maximum inhibition of platelet aggregation was expressed according to the formula $\Delta\text{MPA} = \text{MPA}_0 - \text{MPA}_t$, in which MPA_t was the MPA value at time *t* post-dose, and MPA_0 was the MPA value at baseline. Flow cytometric

analysis of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation was performed with a commercial kit (PLT VASP/P2Y₁₂ Test Kit; Diagnostica Stago, Marseille, France) and an FACS Vantage SE cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA); the platelet reactivity index (PRI) was calculated, and the results were expressed as ΔPRI , which was the difference between PRI value at baseline and PRI value at time *t* post-dose. Concentrations of the active metabolite of clopidogrel were analyzed in plasma obtained from 5-mL blood samples collected in EDTA, to which 25 µL of 2-bromo-3'-methoxyacetophenone (500 mmol L⁻¹ in acetonitrile) had been immediately added to stabilize this active metabolite. Blood samples were immediately centrifuged, and aliquots of plasma were stored at -80 °C until analysis. The active metabolite was assayed with a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method and an appropriate standard as previously described [21]. The lower limit of quantification of this method is 0.8 ng mL⁻¹. The total area under the plasma concentration–time curve from time zero to infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$) was estimated by a non-compartmental analysis with a log-linear trapezoidal method (R software, version 2.9.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The peak plasma concentration (C_{max}) was read directly from the experimental data.

The pharmacokinetic parameters varied substantially between the eight subjects receiving a single 600-mg dose of clopidogrel. The C_{max} of the active metabolite of clopidogrel ranged from 37 to 131 ng mL⁻¹ (median: 79 ng mL⁻¹); the respective value for $\text{AUC}_{0-\infty}$ was 65–244 ng mL⁻¹ × h (median: 112 ng mL⁻¹ × h). The pharmacodynamic response to 600 mg of clopidogrel also varied widely. The VASP data showed that inhibition of P2Y₁₂ receptors at C_{max} ranged from 15% to 86% (median: 53%). At 10 µmol L⁻¹ ADP, maximum inhibition of platelet aggregation ranged between 51% and 74% (median: 61%). At 5 µmol L⁻¹ ADP, the respective figures were 36% and 67% (median: 52%). The pharmacodynamic response to clopidogrel was related to the extent of exposure to its active metabolite: both C_{max} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ were significantly correlated with the results of platelet function tests, regardless of the type of test used (Fig. 1). For both parameters, higher correlation coefficients were obtained with flow-cytometric VASP analysis ($R = 0.79$ and $R = 0.84$, respectively; $P < 0.05$) than with light transmittance aggregometry ($R < 0.75$). Concerning the latter, the highest correlation coefficients were obtained when ADP was used at the concentration of 5 µmol L⁻¹ ($R = 0.76$ for C_{max} and $R = 0.78$ for $\text{AUC}_{0-\infty}$) than when it was used at 10 µmol L⁻¹ ($R = 0.77$ and $R = 0.70$, respectively).

This study in healthy volunteers receiving a single 600-mg dose of clopidogrel, evaluating the relationship between plasma concentrations of the active metabolite of clopidogrel, determined using a validated method, and the results of platelet function tests, confirmed that the VASP assay, which specifically evaluates P2Y₁₂ receptor inhibition, is of greater value than light transmittance aggregometry for monitoring the biological activity of clopidogrel [6,19]. This may not be

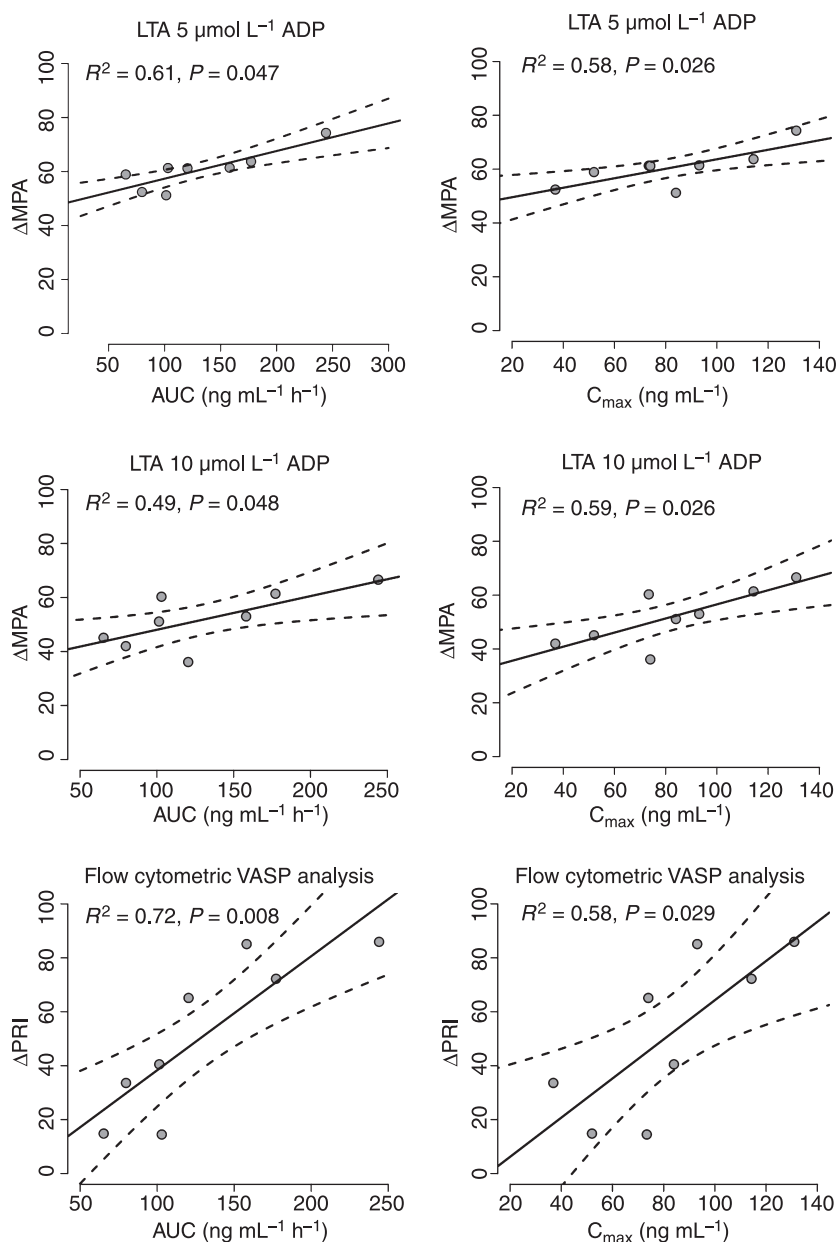


Fig. 1. Relationships between the plasma concentration–time curve from time zero to infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$) and peak plasma concentrations (C_{max}) of the clopidogrel active metabolite, and the results of platelet function tests after administration of 600 mg of clopidogrel to healthy volunteers. Platelet aggregation was assessed with light transmittance aggregometry (LTA) and ADP at 5 and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$; the results were expressed as maximum inhibition of platelet aggregation (ΔMPA). Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation was measured by flow cytometry; the results were expressed as platelet reactivity index. Solid lines represent the linear regression fit to the data; dashed lines indicate 95% confidence intervals. The linear association between two variables was determined by means of Pearson's test; the coefficient of determination (R^2) and the corresponding P -values were calculated.

surprising, as light transmittance aggregometry also reflects P2Y_1 receptor-mediated aggregation not inhibited by thienopyridines [10,22]. Concerning light transmittance aggregometry, the stronger aggregatory stimulus (i.e. ADP at 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ vs. 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) appeared to better differentiate individual sensitivity to platelet inhibition by clopidogrel [23]. It is not known whether the dose of clopidogrel administered might affect the value of the tests evaluating the response to this

drug; in this study, volunteers were treated with a loading dose of clopidogrel (600 mg), and this dose, which provides faster and better inhibition of platelet aggregation than lower doses, was shown to be associated with a lower rate of low response [24]. The originality of these results is that platelet inhibition by clopidogrel was correlated with both C_{max} and $\text{AUC}_{0-\infty}$, which is consistent with the fact that the active metabolite of clopidogrel irreversibly inhibits binding of ADP to P2Y_{12}

receptors [4]. Previous studies have shown this correlation, but only with C_{\max} , probably because of the assay method for the active metabolite of clopidogrel [23,25]. Indeed, in our study, the active metabolite of clopidogrel was assayed with a reference standard and a validated stabilization procedure based on two principles: first, as for all calibration curves used to measure plasma levels of a given drug, we should use the drug itself – in the same way, it is also crucial to use a calibration curve obtained with the active metabolite itself [21,26] rather than clopidogrel [23,25]; and second, as described by Takahashi *et al.* [26], owing to rapid inactivation of the metabolite (80% of the initial concentration is degraded within 10 min), it is necessary to effectively stabilize the metabolite in the blood sample in which it is to be assayed, in order to avoid an underestimation of active metabolite concentration. This explains why, after administration of the same 600-mg dose of clopidogrel, plasma concentrations of the active metabolite ranged from 40 to 140 ng mL⁻¹ in our study, as compared with only 5–35 ng mL⁻¹ in a previous study using a different stabilization procedure [23].

In conclusion, with the use of a reference standard and validated stabilization procedure to assay the plasma concentration of the active metabolite of clopidogrel, we have confirmed the relationship between these concentrations and the results of platelet function tests. The flow cytometric VASP assay may be a valuable platelet function test for monitoring responsiveness to clopidogrel and individually tailoring clopidogrel therapy in routine practice. Assay of plasma concentrations of the active metabolite of clopidogrel may be an alternative to platelet function tests, provided that a validated method is used.

Acknowledgements

This research has received funding support from the University Hospital of Saint-Etienne, and was promoted by the University Hospital of Saint-Etienne.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Appendix

The study group was as follows.

Coordinating center: P. Garnier, A. Garcin, B. Deygas and S. Laporte. Laboratory test: X. Delavenne, N. Mallouk and M. Piot. Data management: C. Bernabe and C. Chauvet. Investigators: P. Garnier, V. Bost, F. Robert, K. Guillot and P. Mismetti.

References

- 1 Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE Jr, Chavey WE 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM *et al.* ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**: e1–157.
- 2 King SB 3rd, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Morrison DA, Williams DO, Feldman TE, Kern MJ, O'Neill WW, Schaff HV, Whitlow PL, ACC/AHA/SCAI, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM *et al.* 2007 focused update of the ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2008; **51**: 172–209.
- 3 Kushner FG, Hand M, Smith SC Jr, King SB 3rd, Anderson JL, Antman EM, Bailey SR, Bates ER, Blankenship JC, Casey DE Jr, Green LA, Hochman JS, Jacobs AK, Krumholz HM, Morrison DA, Ornato JP, Pearle DL, Peterson ED, Sloan MA, Whitlow PL *et al.* 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2009; **54**: 2205–41.
- 4 Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L; French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; **360**: 363–75.
- 5 Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007; **154**: 221–31.
- 6 Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy. *Am J Cardiol* 2009; **104**: 227–33.
- 7 Combescure C, Fontana P, Mallouk N, Berdague P, Labruyere C, Barazer I, Gris JC, Laporte S, Fabbro-Peray P, Reny JL; for the CLOVIS study group. Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 923–33.
- 8 Heestermaas AA, van Werkum JW, Schömig E, ten Berg JM, Taubert D. Clopidogrel resistance caused by a failure to metabolize clopidogrel into its metabolites. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1143–5.
- 9 Erlinge D, Varenhorst C, Braun OO, James S, Winters KJ, Jakubowski JA, Brandt JT, Sugidachi A, Siegbahn A, Wallentin L. Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite, but their platelets respond normally to active metabolite added ex vivo. *J Am Coll Cardiol* 2008; **52**: 1968–77.
- 10 Wallentin L, Varenhorst C, James S, Erlinge D, Braun OO, Jakubowski JA, Sugidachi A, Winters KJ, Siegbahn A. Prasugrel achieves greater and faster P2Y₁₂ receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008; **29**: 21–30.
- 11 Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, Jakubowski JA, Naganuma H, Winters KJ. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function:

- magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J* 2007; **153**: 66.e9–16.
- 12 Aleil B, Jacquemin L, De Poli F, Zaehring M, Collet JP, Montalescot G, Cazenave JP, Dickele MC, Monassier JP, Gachet C. Clopidogrel 150 mg/day to overcome low responsiveness in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention: results from the VASP-02 (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein-02) randomized study. *JACC Cardiovasc Interv* 2008; **1**: 631–8.
 - 13 Bonello-Palot N, Armero S, Paganelli F, Mancini J, De Labriolle A, Bonello C, Lévy N, Maillard L, Barragan P, Dignat-George F, Camoin-Jau L, Bonello L. Relation of body mass index to high on-treatment platelet reactivity and of failed clopidogrel dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2009; **104**: 1511–15.
 - 14 Sharma RK, Reddy HK, Singh VN, Sharma R, Voelker DJ, Bhatt G. Aspirin and clopidogrel hyporesponsiveness and nonresponsiveness in patients with coronary artery stenting. *Vasc Health Risk Manag* 2009; **5**: 965–72.
 - 15 Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009; **360**: 354–62.
 - 16 Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, Pollin TI, Post W, Parsa A, Mitchell BD, Faraday N, Herzog W, Gurbel PA. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 2009; **302**: 849–57.
 - 17 Plavix (Clopidogrel Bisulfate). Label information. http://www.access-data.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020839s042lbl.pdf. Accessed 12 March 2010.
 - 18 Ellis KJ, Stouger GA, McLeod HL, Lee CR. Clopidogrel pharmacogenomics and risk of inadequate platelet inhibition: US FDA recommendations. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 1799–817.
 - 19 Aleil B, Léon C, Cazenave JP, Gachet C. P2C19*2 polymorphism is not the sole determinant of the response to clopidogrel: implications for its monitoring. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1747–9.
 - 20 Wallentin L. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J* 2009; **30**: 1964–77.
 - 21 Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA, Kurihara A. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2008; **48**: 1219–24.
 - 22 Bouman HJ, Parlak E, van Werkum JW, Breet NJ, ten Cate H, Hackeng CM, ten Berg JM, Taubert D. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 482–8.
 - 23 Delavenne X, Basset T, Zufferey P, Mallouk N, Laporte S, Mismetti P. UPLC method for quantitation of clopidogrel active metabolite. *J Sep Sci* 2010; **33**: 1968–72.
 - 24 Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 466–72.
 - 25 Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, Schömig A, Schömig E. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 2004; **92**: 311–16.
 - 26 Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**: 1392–6.

von Willebrand factor clearance does not involve proteolysis by ADAMTS-13

I. BADIROU,* M. KURDI,* J. RAYES,* P. LEGENDRE,*†, O. D. CHRISTOPHE,*† P. J. LENTING*† and C. V. DENIS*†

*INSERM U770, Le Kremlin-Bicêtre; and †UMR_770, Univ Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

To cite this article: Badirou I, Kurdi M, Rayes J, Legendre P, Christophe OD, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor clearance does not involve proteolysis by ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2338–40.

Identification of clearance mechanisms of von Willebrand factor (VWF) has been the subject of an increasing number of studies in the past few years. Indeed, clearance, as well as biosynthesis, contributes to the maintenance of steady-state plasma levels of VWF. Furthermore, VWF variants with increased clearance have now been identified that can lead to

von Willebrand disease (VWD) [1]. Among potential determinants of VWF clearance kinetics, the glycosylation profile of the molecule and the presence of some mutations have been reported to play a role. Another candidate potentially regulating VWF removal is ADAMTS-13 (A Disintegrin and Metalloprotease with ThromboSpondin motif), the protease that specifically cleaves VWF to prevent accumulation of very high-molecular weight multimers in plasma. It is not uncommon that proteolysis of proteins is taken by the body as a sign for removal and it has been suggested that this may apply to VWF as well [2]. However, data available so far are not in support of this hypothesis. First, no difference in survival was observed for plasma-derived human VWF fractions enriched in either high (predominantly 14-mers and higher) or low (predominantly dimers and tetramers) molecular weight

Correspondence: Cécile V. Denis, INSERM U770, 80 rue du General Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.
Tel.: +33 149595605; fax: +33 146719472.
E-mail: cecile.denis@inserm.fr

DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04012.x

Received 26 July 2010, accepted 30 July 2010

36

Adverse drug reactions in patients older than 70 years during two heat waves in France (2003 and 2006)F Mazens^a, A Sommet^a, G Durrieu^a, M Lapeyre-Mestre^a, JL Montastruc^a, the French Network of Pharmacovigilance ^aToulouse – France

Introduction: Exceptional heat waves have occurred in France during summers 2003 and 2006. Among the different risk factors of hosp-h-mortality during these periods, drugs were reported to be one of the possible causes. A precedent study underlined the role of the 2003 heat wave in the occurrence of serious adverse drug reactions (ADRs) in elderly (1). The objective of this work was to compare ADRs in patients older than 70 years reported to the French Network of Pharmacovigilance during the 2006 summer heat wave with those occurred during 2003.

Methods: All 'serious' ADRs occurred in patients older than 70 years between 1st July and 31st August 2006, reported to the French Network of Pharmacovigilance Centres and recorded in the French Pharmacovigilance Database were analysed with respect to age, gender, type of ADR, drug involved, evolution as well as imputability of heat wave (IHW). The last item was defined after full revision of the whole reports. Each report was reviewed by two of us to determine the role of heat in ADR using a scale ranging from *unlikely* (IHW0), *possible* (IHW1), *plausible* (IHW2) and *likely* (IHW3). Data of 2006 were compared to the data observed in 2003.

Results: The total number of 'serious' ADRs registered in the French Pharmacovigilance Database in patients older than 70 years was similar in 2003 ($n = 304$) and 2006 ($n = 353$). Seventy-two patients were concerned (29 'IHW1', 29 'IHW2' and 14 'IHW3'), with a maximal peak between the 10th and the 29th July. The most frequently ADRs were metabolic (dehydration, hydroelectrolytic disturbances), neuropsychiatric (confusion, sleepiness), renal (acute renal insufficiency), general with hyperthermia. Drugs more frequently involved were diuretics, angiotensin receptor antagonists (sartans), angiotensin converting enzyme inhibitors, antiparkinsonians, anti infectious, antidepressant (mainly serotonin reuptake inhibitors), neuroleptics, digoxin and oral hypoglycemics.

Two main differences were found with 2003 heat wave: less antidepressant and hypoglycaemic and anti infectious drugs were involved for a similar total number of reported ADRs linked to heat wave (68 in 2003, 72 in 2006).

Conclusion: The main characteristics of serious ADRs occurred in patients older than 70 years during heat wave were similar in 2003 and 2006. Diuretics were most frequently involved, whatever the year of study. However, different pharmacological classes were concerned in 2003 and 2006. The decrease of antidepressant and hypoglycaemic drugs could be explained by a better caring after lessons from 2003. The increase of antiparkinsonian, antiepileptic, hypoglycaemic and anti infectious drugs may identify patients at risk, with other diseases.

37

'Contrat de bon usage' and pharmacovigilanceH Jantzen^a, D Carlhant Kowalski^a, C Riché^a ^aBrest – France

Introduction: A French decree about the good medical practice concerning drug prescription, called the '*contrat de bon usage*', has been published in 2005. This '*contrat de bon usage*' is signed by the director of regional agency of hospitalisation and the legal representative of all public and private hospitals of the region. It is established for 3–5 years. The issue of this contract is to determine the actions developed by each hospital to improve and secure the medicinal product circuit from prescription to recipient. It aims to assess health professional practice in their implementation for achieving these objectives. In this paper, we are wondering about the contribution of pharmacovigilance (PV) activities to help hospitals to answer the purpose of this contract.

Methods: We postulated that the good use of PV tools like signal detection by notification is an essential step to risk's management which is highlighted in the '*contrat de bon usage*'. Through the annual assessment of the regional pharmacovigilance centre (CRPV) we searched indicators showing knowledge and a good application of PV rules.

Results: Some of PV data collecting by the CRPV are gathered in 3 topics reflecting the health public politics, the culture of risk and the reactivity of the system in the matter of drug use:

The indicators can be given hospital by hospital. A regional public health approach can be proposed in respect of geographical sectors and hospitalisation bed numbers.

Health public politics of the hospital	Risk's culture of health professionals	Reactivity of the PV system
1. Identification of a local PV correspondent	1. Qualitative values of PV notification as serious, unexpected and preventable ADR	1. Actions of prevention after a local signal
2. Quantitative values of the PV notification	2. Number and classification of questions to the CRPV	2. Contribution to the national prospective follow-up of a molecule or a pharmacologic class
like adverse drug reaction, medicinal errors and quality product defects		3. Respect of the legal delay

Conclusion: In the concept of '*contrat de bon usage*' and pharmacovigilance, the CRPV collects the PV data for public and private hospitals. Then, it becomes a regional observatory of drug iatrogenic disease and a data provider on the quality of prescription for each hospital and for the regional administrative authority.

38

Use of laxatives without medical prescription: assessment of stimulant laxative misuse or abuseH Theophile^a, G Miremont-Salamé^a, A Abouelfath^a, I Jeantaud^a, N Moore^a, F Haramburu^a ^aBordeaux – France

Introduction: Stimulant laxatives can cause serious medical disorders in long term users such as hypokalemia and pseudomelanosis coli. The aim of this study was to describe a population of over-the-counter laxative users and to evaluate misuse or abuse of stimulant laxatives.

Methods: A prospective study was performed among a random sample of 151 pharmacies in the Aquitaine, region of France, to identify all sales of laxatives without medical prescription during a 2-week period (19th of June – 2nd of July,

2006). Data on characteristics of users (age, sex, morphology and type of customer), laxatives use (drug name, number of units, daily dose, duration, frequency and reason of use) and other medicines were collected in a structured questionnaire. The users of stimulant laxatives were compared to the users of other laxatives. Participating pharmacists were also asked to give their opinion on laxative misuse or abuse.

Results: Twenty nine pharmacies participated (participation rate 19.2%); 137 users were included: 86.1% were female and 64.2% were known customers of the pharmacy. The median age was 60 years. Laxatives were used for more than one year by 59.9% of the users and daily by 35.8%. The reasons for laxative use were chronic constipation (44.5%), occasional constipation (26.3%), 'It is the only thing that works' (11.7%), weight loss (8.0%), due to a current drug treatment (3.6%), other reasons (3.6%). More than one laxative brand was purchased by 18.2% of the users. Stimulant laxatives were the most commonly used (62.0%) followed by hyperosmotic agents (18.2%), lubricant agents (14.6%), suppositories or enema (13.1%) and bulking agents (10.2%). The users of stimulant laxatives compared to the users of other laxatives was more often female ($P = 0.0038$) and evoked more frequently 'It is the only thing that works' ($P = 0.0047$). Among the users of stimulant laxatives, chronic users (57.6%) and those who used laxatives for weight loss (8.2%) could be considered as potential misusers or abusers of stimulant laxatives. Overall, on these two criteria, 60.0% of the users of stimulant laxatives were estimated to be potential misusers or abusers. Furthermore, among pharmacists, 55.2% considered laxative misuse or abuse as a problem and 13.8% thought that it was an increasing phenomenon.

Conclusion: Misuse or abuse of stimulant laxatives is far from hosporg and concerns mostly an elderly population. This could have serious medical consequences. Guidelines on constipation treatment would be useful as laxatives have only a place in acute cases.

39

An indirect PK-PD model to assess interaction between acenocoumarol and amoxicillin + clavulanic acidX Delavenne^a, T Basset^a, N Moulin^a, JP Gay^a, H Decousus^a, P Mismetti^a, S Laporte^a ^aSaint-Etienne – France

Introduction: Acenocoumarol, a vitamin K antagonist, is widely used in Europe. Because of its widespread and long term use, acenocoumarol is frequently associated with other drugs. Amoxicillin plus clavulanic acid is a largely prescribed antibiotic combination. Thanks to clinical observations giving evidence of pharmacodynamic variations of acenocoumarol during concomitant administration of amoxicillin plus clavulanic acid, we decided to investigate the influence of amoxicillin plus clavulanic acid drug interaction on PD marker using a population pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model.

Methods: A total of eight healthy volunteers were enrolled. Each subject received at day 1 a single dose of 8 mg of acenocoumarol. Then 1 g of amoxicillin +250 mg of clavulanic acid was given from day 3 to day 9. On day 8, each subject received a single dose of 8 mg of acenocoumarol concomitantly to the antibiotic drug. Eleven blood samples were taken during 48 hours following each acenocoumarol administration yielding a total of 176 blood samples. Acenocoumarol plasmatic concentrations and prothrombin time were measured at each blood sample. We first identified the PK structural model by pooling this trial with individual data from other PK acenocoumarol trials (1). Indirect response model was used to fit PD data (2). Models were built using a non-linear mixed effect modelling approach with NONMEM software. Covariates were tested on PK and PD parameters including antibiotic treatment.

Results: PK data of acenocoumarol was fitted by a two compartments first order input model with log normal inter-individual variability. Weight and antibiotic treatment were found to significantly improve the fit of PK data (based on the objective function), with a 15% decrease in the acenocoumarol clearance in case of antibiotic association ($P < 0.05$). An indirect response model was successfully applied to PK-PD data of acenocoumarol. No covariate and especially the antibiotic treatment effect had significant influence on prothrombin time.

Conclusion: Despite some case reports of clinical suspicions, amoxicillin plus clavulanic has no effect on the pharmacodynamic activity of acenocoumarol, as assessed by prothrombin ratio.

40

Nelfinavir-M8 pharmacokinetic modeling of placental transfer, a population studyD Hirt^a, S Urien^a, V Jullien^a, G Firtion^a, H Chappuy^a, E Rey^a, G Pons^a, L Mandelbrot^b, JM Treluyer^a ^aParis – France ^bColombes – France

Introduction: A population pharmacokinetic model was developed in order to describe the transfer of nelfinavir and its active metabolite M8 from maternal to cord plasma and amniotic fluid.

Methods: Individual characteristics that may influence nelfinavir-M8 concentrations were investigated. This study included 75 women on delivery day for whom maternal, umbilical plasma and amniotic fluid samples were collected. To these, 53 pregnant, 61 non pregnant and 7 consecutively pregnant and non pregnant women were added to the database. Data were analysed with NONMEM.

Results: Nelfinavir and M8 concentrations in maternal plasma, umbilical plasma and amniotic fluid were described as 6 connected compartments. Mean population estimates (pharmacokinetic and inter-subject variabilities in %) were: absorption rate 0.67 h^{-1} , lag time 0.87 h, apparent nelfinavir elimination clearance and volume of distribution: 39.5 L/h (53%), 557 L for non pregnant + pregnant women and 115 L/h (132%) and 1626 L on the day of delivery, M8 formation clearance 0.77 L/h and M8 elimination rate constant 3.41 h^{-1} (74%). For nelfinavir and M8 respectively, the mother-to-cord parameters were 0.058 L/h (34%), and 0.35 h^{-1} (76%), the cord-to-amniotic fluid rate constants were 0.23 and 0.59 h^{-1} , and elimination rates from amniotic fluid were 0.36 and 0.49 h^{-1} . Nelfinavir fetus-to-maternal concentration ratio was approximately 25% for maternal concentrations between 0.1 and 2.5 mg/L, in mothers between the 31st and 41st week of gestation.

Conclusion: The weak nelfinavir placental transfer should not contribute to protect the fetus from vertical HIV-1 transmission.

107

Development of anti-infliximab antibodies increases infliximab clearance in chronic inflammatory bowel disease

D Tenant, A Aubourg, C Magdelaine-Beuzelin, D Degenne, H Watier, L Picon, G Pintaud Tours – France

Introduction: Infliximab, an anti-TNF- α monoclonal antibody, has profoundly modified the treatment of several inflammatory diseases. The objective of this study was to assess the influence of antibodies directed towards infliximab (ATI) on infliximab pharmacokinetics.

Methods: Thirty-three chronic inflammatory bowel disease patients in whom infliximab concentration and ATI were monitored on a routine basis, using ELISA techniques, were included. Infliximab pharmacokinetics was analyzed using a two-compartment pharmacokinetic model. Influence of sex, weight, age, disease, concomitant immunosuppressive treatment and ATI on the parameters was investigated using a population approach.

Results: In 5 out of 33 patients, ATI were detected at least once during their follow-up. Mean systemic clearance of infliximab with and without ATI was 0.012 and 0.032 L/hour, respectively ($P < 0.001$). Mean distribution half-life ($t_{1/2-\alpha}$) with and without ATI was 4.3 and 2.5 days, respectively ($P < 0.05$). Mean elimination half-life ($t_{1/2-\beta}$) with and without ATI was 12.4 and 18.8 days, respectively ($P < 0.005$). In 2 patients, an increase in dose led to a decrease in infliximab clearance, suggesting that the influence of ATI may be neutralized by dose adjustment.

Conclusion: These results describe for the first time the quantitative influence of ATI on infliximab clearance. The monitoring of ATI may help to understand failures of infliximab treatment and may guide dose adjustment.

108

Low mycophenolic acid area under the curve is associated with increased systemic lupus erythematosus activityN Zahr^a, JS Hulot^a, J Haroche^a, J Debord^a, N Costedoat-Chalumeau^a, P Cacoub^a, P Marquet^b, JC Piette^a, P Lecha^a, Z Amoura^a Paris – France ^bLimoges – France

Introduction: Mycophenolate Mofetil (MMF) is now widely used for the treatment of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). MMF exposure monitoring could therefore be useful for SLE patients. Recently, we have developed an accurate and easily applied pharmacokinetic model for determining Mycophenolic acid (MPA) exposure using a Bayesian estimator of MPA AUC that employs a three-point MPA concentration sampling strategy in patients with SLE (who do not receive calcineurin inhibitors). Our objectives were to study correlations between MPA AUC and SLE activity and to determine a target MPA AUC in SLE patients.

Methods: 52 consecutive SLE patients, treated by MMF at stable dose for at least 10 weeks were included in the study. SLE activity was assessed by SLEDAI score. MMF was measured by high-performance liquid chromatography coupled to UV absorbance detection. MPA AUC was determined by using a Bayesian estimator of MPA AUC using the MMF[®] program.

Results: 43 women and 9 men (mean age \pm SD at sampling: 34 ± 10 years) were included. 33 patients had inactive (SLEDAI ≤ 5) and 19 an active SLE. All were treated by MMF at the respective doses of 3 g/day ($n = 3$), 2 g/day ($n = 36$), 1.5 g/day ($n = 2$) or 1 g/day ($n = 11$). As expected, MPA AUC_{0-12h} displayed a wide variability: median concentration was 36.5 $\mu\text{g.h/ml}$. We observed that mean MPA AUC_{0-12h} was significantly lower in patients with active versus inactive SLE (21.7 ± 9.3 vs. 46.8 ± 17.5 $\mu\text{g.h/ml}$; $P < 0.0001$). MPA AUC_{0-12h} negatively correlated with the SLEDAI and with anti-dsDNA levels ($r = -0.80$, $P < 0.0001$ and $r = -0.34$, $P = 0.01$; respectively). A positive correlation was found between MPA AUC_{0-12h} and C3 levels ($r = 0.47$, $P = 0.0008$). Finally, SLE activity as assessed by the SLEDAI score dramatically decreased when MPA AUC_{0-12h} was above 35 $\mu\text{g.h/ml}$.

Conclusion: MPA AUC_{0-12h} is the major factor influencing SLE activity in patients treated by MMF. MPA AUC_{0-12h} > 35 $\mu\text{g.h/ml}$ is associated with a dramatic decrease of SLE activity. MMF exposure monitoring could therefore be useful for SLE patients.

109

Population pharmacokinetics of fondaparinux in orthopaedic surgery: the POP-A-RIX studyX Delavanne^a, S Laporte^a, B Deygas^a, D Baylot^a, P Zufferey^a, J Barré^b, P Nguyen^b, JY Borg^c, F Charret^d, P Mismetti, for the GETHCAM investigators ^aSaint-Etienne – France ^bReims – France ^cRouen – France ^dAnnonay – France

Introduction: Fondaparinux is the first synthetic, selective, activated Factor X inhibitor. In patients undergoing orthopaedic surgery, it has shown a benefit over low-molecular-weight heparin despite an increased risk of major haemorrhagic events expressed by the bleeding index. Even if the risk of clinically relevant bleeding was not increased, it could be interesting to determine which patients are more prone to bleed in order to optimize the choice of treatment. To achieve this objective we first performed a population pharmacokinetic study to determine the magnitude of anti-Xa activities and its variability according to patients' characteristics.

Methods: Patients treated with a subcutaneous daily dose of 2.5 mg of fondaparinux for 5–10 days after orthopaedic surgery were included in the POP-A-RIX study. Sparse data (1–3 samples) were collected and plasma concentrations were measured by enzymatic anti-Xa activity. Population pharmacokinetics (PK) was obtained from nonlinear mixed effects modelling in the NONMEM VI program. The structural model was built with 2/3 of patients chosen at random; several covariates were tested to explain inter-individual variability in parameters. The model was then validated by a visual predictive check and finally by using the remaining 1/3 of patients.

Results: A total of 999 patients were included from 8 French centers. The PK of fondaparinux was well described using a two compartment model with first-order absorption. Covariate analysis showed that creatinine clearance (CLCr) and sex were

associated with an increased value of CL ($P < 0.001$). In addition, significant correlation was identified with weight and V2 ($P < 0.001$). The following population parameters were estimated: clearance (CL) 0.24 L/h, central volume of distribution (V2) 8. L, inter-compartment clearance (Q) 0.078 L/h, peripheral volume of distribution (V3) 18.2 L and absorption rate (Ka) 0.72/hour. The inter-patient variabilities for CL, V2, Q, V3 and Ka were 65%, 56%, 68%, 131% and 98%, respectively. Coefficient of variation and standard deviation of the residual error were 12.7% and 0.04 mg/L, respectively.

Conclusion: This is the first population pharmacokinetic study of fondaparinux in patients treated for the prevention of thromboembolism in orthopaedic surgery. CLCr, sex and body surface area account for a part of pharmacokinetic variability. The clinical relevance of these correlations will be assessed by including anti-Xa estimations in a multivariate analysis to predict bleeding events.

110

Involvement of ABCB2 (Mrp2) in the liver transport of the radiotracer ^{99m}Tc-mebrofenin in mice: an in vivo approach

L Monassier, C Goetz, G Ubeaud-Séquier, P Bousquet, A Constantinesco Strasbourg – France

Introduction: The multidrug transporter Mrp2 is involved in the hepatic clearance of many drugs such as methotrexate, irinotecan or paracetamol. An over- or reduced liver activity of this highly polymorphic protein has been associated with severe side effects, particularly diarrhea in patients treated with the cytotoxic compound irinotecan. The aim of this study was to analyze the *in vivo* contribution of Mrp2 in the liver transport of ^{99m}Tc-mebrofenin (^{99m}Tc-M) in mice.

Methods: 12 week-old wild-type (WT; $n = 8$) and Mrp2^{-/-} (KO; $n = 8$) mice were obtained from Taconic (USA). In 2.5% isoflurane anaesthetized mice, a saline-filled catheter was inserted in the tail artery. Then, the animals were placed under a dedicated single pinhole gamma camera (Gaede, Freiburg, Germany) and quickly injected (150 μL) with ^{99m}Tc-M as previously published [1]. The amount of injected radioactivity was $8.0 \pm 0.8\text{mCi}$ in WT and $8.1 \pm 1.3\text{mCi}$ in KO ($P > 0.05$). The liver capture and biliary excretion were followed during 35 minutes by planar scintigraphy, a region of interest being placed in the right lobe.

Results: In WT animals the injection was followed by a rapid capture of the radiotracer (time to half-maximal fixation $n = 0.53 \pm 0.1\text{minute}$) that was surprisingly increased in KO ($0.81 \pm 0.23\text{minute}$; $P < 0.05$). This capture was followed by a monoexponential excretion with a half-maximal excretion of $3.34 \pm 0.5\text{minute}$ in WT that was markedly prolonged in KO ($x6.2$; $20.6 \pm 11.96\text{minute}$; $P < 0.05$). In WT, after 15 minutes, ^{99m}Tc-M still remaining in the liver was 10% of the maximal fixation when 64% was not excreted in KO mice.

Conclusion: In mice, Mrp2 is a major contributor to liver ^{99m}Tc-M efflux transport and biliary excretion. Moreover, we also observe a reduced ^{99m}Tc-M uptake in KO mice. Experiments dedicated to the establishment of a correlation between Mrp2 expression level and activity are in progress but liver scintigraphy with this radiotracer appears as a promising tool to functionally assess Mrp2 activity and therefore the pharmacogenetics of this transporter.

References:

- Goetz C, Choquet P, Monassier L, Breton E, Elfertak L, Constantinesco A. Hepatobiliary morphology and function in normal mice using micro-CT and planar pinhole scintigraphy. *ITBM-RBM*, 2006; 27: 194-202.

111

Lopinavir population pharmacokinetics on HIV-infected pregnant women

M Bouillon-Pichault, JM Treluyer, E Rey, G Pons, V Jullien Paris – France

Introduction: Lopinavir is a protease inhibitor (PI) used in HIV-infection treatment with a current recommended dosing regimen of 400 mg lopinavir with 100 mg ritonavir BID (400/100 LPVr BID). Although lopinavir has not been evaluated on pregnant women, it is nowadays widely used to prevent materno-fetal HIV-transmission. The aim of our retrospective study was to develop a population pharmacokinetic model highlighting the possible influence of pregnancy on lopinavir pharmacokinetics. Such a model could be useful to evaluate the current recommended dose with regard to lopinavir target plasma concentrations in pregnant women.

Methods: The pharmacokinetics of lopinavir were investigated using a population approach performed with NONMEM on 412 samples coming from therapeutic drug monitoring of 180 HIV-1-infected women (77 pregnant, 103 non-pregnant). Individual Bayesian estimates of lopinavir pharmacokinetic parameters were used to calculate the minimal concentrations obtained with various dosage regimens. The final model was used to estimate the probability to achieve previously determined target concentrations in PI-naïve (i.e. 1 mg/L) and PI-pretreated (4 and 5.7 mg/L) patients via Monte Carlo simulations.

Results: Lopinavir pharmacokinetics was well described by a one-compartment model with a first-order absorption rate, with typical population estimates (interindividual variability%) of 4.35 L/h (24%) and 65.9 L (56%) for apparent clearance and distribution volume, respectively. Pregnancy and delivery were found to have an influence on lopinavir pharmacokinetics, increasing apparent clearance by 39% and 59% respectively. Probability to achieve the 1 mg/L target C_{trough} with the recommended dose of 400/100 LPVr BID was greater than 90% for pregnant and non-pregnant women. On the contrary, the probability to achieve the 4 and 5.7 mg/L target C_{trough} s was less than 50/81.5% and 21.1/55.3% respectively for pregnant/non-pregnant women.

Conclusion: The 400 mg lopinavir-100 mg ritonavir BID regimen is efficient to reach a minimal concentration of 1 mg/L for PI-naïve pregnant women but may not be suitable for PI pre-treated pregnant women. Pregnancy and delivery have an influence on the minimal 12h after intake concentration. The safety and efficacy of higher lopinavir doses should be investigated for PI-pre-treated pregnant women.

abacavir, lamivudine and zidovudine but this treatment has been interrupted because of a mild increase in transaminases suspected to be related to this drug combination. More recently, the patient was treated during 6 months by an association of lopinavir-ritonavir and abacavir-lamivudine without significant side-effects except for a mild pruritus and with a good response on viral load. This drug regimen was then withdrawn by the patient. Ten months later, the patient was seen with again a profound immunodeficiency state ($CD4$ cells $<10/mm^3$) and severe oesophageal mycosis. A new HIV-treatment was started based on the combination of abacavir, enfuvirtide and lamivudine. Eight hours after the initiation of this treatment, the patient presented acute respiratory failure with manifestations of hypersensitivity (pyrexia, disseminated skin rash, hypotension). Vigilance alterations, rhabdomyolysis, lactic acidosis and renal failure were associated. Intubation and mechanical ventilation were required during 5 days in a critical care unit. The outcome was then favourable. HLA-B* 5701 allele screening was done and found to be positive.

Conclusion: This case report suggests that HLA-B* 5701 screening may be useful even when previous treatments with abacavir has been used without adverse reactions suggestive of hypersensitivity.

523

Investigation of fondaparinux risk of major hemorrhage: the POP-A-RIX study

X Delavanne, S Laporte, B Deygas, D Baylot, P Zufferey, J Barré, P Nguyen, JY Borg, F Charret, E Presles, P Mismetti

Introduction: Fondaparinux is the first synthetic and selective inhibitor of activated factor X (Xa). Despite a positive benefit-to-risk ratio in prevention of deep venous thrombosis in major orthopedic surgery, fondaparinux as other antithrombotics increase the risk of hemorrhage [1]. We perform a multicenter study of patients treated with fondaparinux after major orthopedic surgery in order to identify the risk factors of major hemorrhage including anti-Xa information as pharmacokinetic data.

Methods: POP-A-RIX is a prospective cohort study of consecutive treated at a prophylactic dosage of 2.5 mg once a day of fondaparinux. The primary endpoint was the incidence of major hemorrhage beginning after the first dose of the study drug and up to 2 days after the last dose of the study drug according to EMEA definition. Measurements of anti-Xa activity in sparse sample were recorded throughout the treatment. Individual pharmacokinetic parameters as clearance, volume of distribution (V_c), half-life and area under the curve were estimated from population model previously described [2]. The covariates included body weight, age, renal function estimated by Cockcroft & Gault (C-G) and simplified MDRD formula, medical history and type of surgery. Multivariate logistic regression analysis was used to investigate the relationship between major hemorrhages and potential risk factors including covariates and pharmacokinetic parameters.

Results: A total of 999 patients were included in this study. Mean age of the population was 73 ± 12 years; 70% of patients are female; 13% presented with a body weight less than 50 kg; 20% have a moderate or a severe renal failure according to C-G formula; 55% of patients presented with a hypertension, 11% a cancer, 11% a diabetes. Overall 37 major hemorrhages were recorded (3.7%). The population pharmacokinetic analysis found a correlation between renal function (C-G definition) and clearance of fondaparinux and body weight and V_c . In the multivariate analysis, a body weight less than 50 kg and a half-life elimination estimated to more than 24 h were associated with an increase risk of major hemorrhages (OR = 2.95 [1.19; 7.33], $P = 0.020$ and OR = 2.36 [0.91; 6.14], $P = 0.077$). On the contrary, total knee replacement and others major orthopedic surgery was associated with a smaller risk than hip surgery (OR = 0.18 [0.04; 0.83], $P = 0.028$).

Conclusion: Our findings suggest that small body weight was a potential risk factor for major hemorrhages in patients treated with fondaparinux after major orthopedic surgery. A more predictive and easy-to-use PK parameter than half-life elimination, such as anti-Xa activity at a given time should be assessed.

524

Zolpidem and zopiclone evening intake in elderly subjects impair driving performance the next morning

ML Bocca, F Bertran, C Couque, S Marie, T Desfemmes, A Coquerel, C Berthelon, M Moessinger, V Lelong-Boulouard, P Denise

Introduction: Elderly people represent a large part of drivers and the proportion will increase in the future in most occidental countries. Paradoxically, while insomnia is more frequent in elderly, most experimental studies assessing drugs effects are conducted on healthy young subjects. No experimental study have been performed to assess in elderly subjects, the residual effects of the two hypnotics the most prescribed, particularly in France, zolpidem and zopiclone, on driving performance and cognitive functions. The purposes of this work were to characterize and compare in healthy elderly subjects the residual effects of zolpidem (Zp) and zopiclone (Zc) vs. a benzodiazepine (flunitrazepam Fln) and a placebo (Pla), on (i) a monotonous car driving performance assessed using a driving simulator (ii) cognitive functions related to driving skills (flexibility, attention, working memory). Simultaneously, the night under medication was recorded with polysomnography to determine the effects of these compounds on sleep architecture.

Methods: Sixteen healthy elderly volunteers (55 to 65-years-old) were recruited. Each subject took, at 11.00 pm the day before each session, a dose of either Zp 10 mg, Zc 7.5 mg, Fln 1 mg or a Pla. The study was conducted according to a balanced, double blind, cross-over design. A monotonous driving task was performed on a mono-screen driving simulator during 1 h. The driving performance was assessed by the standard deviation of the lateral position (SDLP, m) and of speed (SDS, km/h) and the number of road exits (RoadE, n). Cognitive performance was assessed using neuropsychological tests (DSST, number letter, + minus test) and oculomotor tests (saccades, antisaccades). Two blood samples were collected at 8.30 am and 2.00 pm.

Results: Zp and Zc significantly increased SDLP ($P < 0.00001$), SDS ($P < 0.01$) and RoadE ($P < 0.05$). No effect was founded with Fln. The three hypnotics increased REM sleep latency ($P < 0.01$), total sleep duration ($P < 0.04$) and decreased the

amount of awake after sleep onset ($P < 0.04$). Residual blood concentrations were found with zolpidem at 8.30 am and 2.00 pm in 11 subjects over 16.

Conclusion: The main result of this study is that Zp has residual effects on driving in elderly subjects more than 10 h after intake. Our study is the first one showing residual effects of this hypnotic. It reveals that elderly subjects were sensitive to this drug, contrary to young subjects (Bocca 1999). Results will be interpreted in light of pharmacokinetics, subjective assessments, polysomnographic and cognitive tasks data.

Reference:

1. Bocca ML et al. Residual effects of zolpidem 10 mg and zopiclone 7.5 mg versus flunitrazepam 1 mg and placebo on driving performance and ocular saccades. *Psychopharmacology* 1999;143(4):373–379.

525

Apomorphine effect on pain threshold in Parkinson's disease: a clinical and positron emission tomography study

E Dellapina, A Gerdelat-Mas, F Ory-Magne, L Pourcel, F Calvas, M Galitsky, C Thalamos, P Payoux, C Brefel-Courbon

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a painful disorder. Previous studies have shown that levodopa administration raised pain threshold and reduced pain-induced cerebral activations of PD patients compared with healthy subjects. However, in the central nervous system, levodopa is not only converted in dopamine but also in norepinephrine and the noradrenergic system is involved in nociception. The aim of this randomized, double blind study was to compare the effect of a dopamine agonist (apomorphine) vs. placebo on pain thresholds (subjective and objective) and on cerebral activity (Positron Emission Tomography, PET) during experimental nociceptive stimulation in two groups of PD patients (with and without neuropathic pain).

Methods: Subjective pain threshold (using thermal stimulation, thermotest) and objective pain threshold (assessed by the nociceptive flexion reflex) were determined during two randomized conditions: after a subcutaneous injection of apomorphine and after a subcutaneous injection of a placebo. H2150 PET analysis of regional cerebral blood flow was performed on patients while they received alternate and randomized noxious and innocuous thermal stimulations during the two conditions. Twenty-five PD patients participated to this study (12 painful and 13 non painful patients).

Results: Subjective and objective nociceptive thresholds were not significantly modified by administration of apomorphine ($45.5 \pm 2.7^\circ\text{C}$ and 9.4 ± 3.7 mA, respectively) in comparison with placebo injection ($45.6 \pm 2.8^\circ\text{C}$ and 10.7 ± 3.6 mA, respectively) in 25 PD patients. In addition, apomorphine did not modify pain thresholds in any groups of PD patients. Neuroimaging results showed that noxious thermal stimulation induced activations of cerebral areas classically involved in pain processing network. Administration of apomorphine did not modify the pain activation profile in non painful nor painful PD patients ($P \leq 0.01$; $k \geq 50$; $z\text{-score} \geq 3$).

Conclusion: This study shows that, although levodopa reverses abnormal pain processing in Parkinson's disease, administration of apomorphine has no effect. We suggest that noradrenergic system could be involved in processing nociceptive information in PD and dopaminergic system could have only a minor role.

526

Dose-related effects of subanesthetic intravenous ketamine upon neurocognitive functions in healthy subjects

J Micallef-Roll, C Audebert, C Casse-Perrot, F Roubey, M Lunnon, S He, O Blin

Introduction: One of the receptors for glutamate is the NMDA receptor and this is believed to be hypofunctional in schizophrenia. Also, Ketamine, an antagonist NMDA receptor, is used as a model of challenge of psychosis in order to test the effect of potential/known antipsychotic agent. The aim of this study is to investigate the effect of ketamine upon cognitive assessment and saccadic eye movements.

Methods: A randomised, placebo controlled double blind 3 way cross - over study was performed among 18 subjects. They were male, aged between 18 and 45 years, healthy and free in particular of personal and familial psychiatric symptoms or disease. Two doses of ketamine were tested: 0.15 mg/kg of bolus following by 0.625 mg/Kg/h over 80 min and 0.10 mg/kg of bolus following by 0.417 mg/kg/h over 80 min. The pharmacodynamic criteria were: episodic and working memory (recall of words, sevens back, letter number sequencing tests), measurement of anti-saccades, BPRS.

Results: The administration of ketamine showed significant and dose-related effects on all parameters: – episodic memory: delayed recall of 20 words: with high dose 8.6 less words ($P < 0.0001$) vs. 5.3 ($P < 0.0001$) with low dose; immediate recall: 7.9 less words ($P < 0.0001$) with high dose vs. 3.4 ($P < 0.0001$) with low dose – working memory: on the sevens back test, a difference of 9.5 substractions ($P < 0.0001$) was seen with high dose vs. 5.5 ($P < 0.0001$) with low dose – saccadic eye movement: the effect was variable and only a significant dose effect could be seen upon the percentage of errors and the amplitude of the first saccade – BPRS negative score: increase of 2.9 points for the high dose vs. 2.1 points for the low dose.

Conclusion: In this study in healthy subjects, a significant and dose related effect was observed upon psychiatric symptoms as measured by the BPRS scale, tests of episodic and working memory, percentage of errors in the anti-saccadic task. This work validates also an experimental design for future studies and confirms the interest of the phase 0 in clinical pharmacology.

527

Cannabis-related adverse events: a hospitalization-based pharmacoepidemiological study

E Jouanjan, M Tubéry, F Leymarie, M Lapeyre-Mestre


Introduction: Cannabis is the most prevalent illicit drug of abuse in France. However, little is known about serious health complications related to its use, particularly in terms of somatic health complications. The present study aimed to assess the impact of cannabis use in the French Haute-Garonne area through hospital data collection and analysis.

[Close window](#)

PAGE. Abstracts of the Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe.
ISSN 1871-6032

Reference:

PAGE 16 (2007) Abstr 1115 [www.page-meeting.org/?abstract=1115]


The use of an indirect response model to assess interaction between drugs: acenocoumarol and amoxicillin + clavulanic acid	
X Delavenne (1), T Basset (2), P Girard (3) , H Decousus (1,4), P Mismetti (1,4), S Laporte (1)	
(1) Department of clinical pharmacology, EA3065, Saint-Etienne University Hospital, France; (2) Laboratory of pharmacology and toxicology, Saint-Etienne University Hospital, France; (3) EA3738, Faculté de Médecine de Lyon Sud, Oullins, France;(4) Department of Internal medicine and therapeutics, EA3065, Saint-Etienne University Hospital, France	Xavier Delavenne
Poster: Applications- Coagulation	
PDF poster/presentation:	 Click to open
<p>Objectives: It has been reported in the literature an increase of anticoagulation level, assessed by prothrombin time, when acenocoumarol, an oral antivitamin K, is associated with amoxicillin plus clavulanic acid (antibiotic drug). The aim of present study was to investigate quantitatively the influence of amoxicillin plus clavulanic acid on pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) of acenocoumarol.</p> <p>Methods: A single dose of 8 mg of acenocoumarol were orally administered to 8 healthy volunteers on day 1 and 8. From day 3 to 9, the volunteers received 1g of amoxicillin + 250 mg of clavulanic acid. Eleven blood samples were collected at day 1 and at day 8 for each volunteer; plasma concentrations of acenocoumarol and prothrombin time ratio (PTR) were measured. The PK-PD analysis was performed with a non-linear mixed effect model in NONMEM using FOCE INTERACTION method. In a first step, the structural PK model was identified by pooling the present dataset with other individual data from PK acénocoumarol trials. In a second step, an indirect PK-PD model was build conditional on the individual Bayesian PK parameter estimations from first step; PTR was fitted to an indirect action model with inhibition of the response synthesis as described by Dayneka [1]. The model is composed of two functions, one for the clotting factor (CF) and one for PTR: $dCF/dt = K_{in} * (1 - (C_p / (C_p + C_{50}))) - K_{out} * CF$ $PTR = PTR_0 * CF / (\theta + CF)$, CF are the clotting factors, θ is the hyperbolic parameter. Demographic covariates, as well as antibiotic treatment effect, were tested on PK and PD parameters. The model was validated by visual predictive check.</p> <p>Results: Plasma concentrations of acenocoumarol were best fitted with a two compartment and first-order absorption model. Weight was included as covariate on V2 and antibiotic treatment effect on CL, thus reducing unexplained inter-individual variabilities from 10.0% to 0.3% for V2 and from 12.2% to 8.7% for CL. A significant 15% decrease in anecocoumarol clearance was observed when antibiotic was prescribed. PTR levels were well fitted by the indirect response model, but no significant covariate were identified, and especially the co-administration of antibiotic did not induce any significant changes on the prothrombin time.</p> <p>Conclusions: To our best knowledge, this is the first application of an indirect response model to acenocoumarol data for assessing drug interaction. The only drug interaction with antibiotic that was found in this study was at the PK level, but not at PD level. Despite some case reports of clinical suspicions, amoxicillin plus clavulanic acid do not seem to affect the pharmacodynamic activity of acenocoumarol as assessed by prothrombin time.</p> <p>Reference: [1] J Pharmacokinet Biopharm 1993; 21: 457-78.</p>	

[Close window](#)

PAGE. Abstracts of the Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe.
ISSN 1871-6032

Reference:

PAGE 17 (2008) Abstr 1293 [www.page-meeting.org/?abstract=1293]

Assessment of pharmacokinetic variability of fondaparinux in 809 patients treated after major orthopedic surgery: the POP-A-RIX study	
Delavenne X (1), Laporte S (1,2), Deygas B (1,2), Baylot D (3), Zufferey P (4), Barré J (5), Nguyen P (6), Borg JY (7), Charret F (8) and Mismetti P (1), for the GETHCAM investigators	
(1) Dept. of Clinical Pharmacology ; EA 3065 ; University Hospital . (2) Inserm, CIE3, University Hospital of Saint-Etienne, France.(3) Clinique Mutualiste de Saint-Etienne, France. (4) Dept. of Anesthesiology and Intensive Care ; EA3065 ; University Hospital of Saint-Etienne, France.(5) Dept. of Anesthesiology, Robert Debré hospital, Reims, France.(6) Central Lab. of Hematology, Robert Debré hospital, Reims, France.(7) Hemostasis Unit, University Hospital of Rouen, France.(8) Clinique des Cévennes, Annonay, Franceof Saint-Etienne, France.	Xavier Delavenne
Poster: Applications- Coagulation	
PDF poster/presentation:	 Click to open
<p>Objectives: Fondaparinux is a synthetic antithrombotic agent with specific anti-factor Xa activity. Despite a favorable benefit risk ratio in average, fondaparinux as other antithrombotics increase the risk of hemorrhage. One of the objectives of this study is to characterize pharmacokinetic of this drug according to patient characteristics using a population model, which may help to predict the risk of hemorrhage in specific populations.</p> <p>Methods: Prophylactic dosage (2.5 mg once a day) of fondaparinux was administrated during at least 5 days. One to four samples were collected throughout the duration treatment. Plasma concentrations were assayed by enzymatic anti-Xa activity method. Population pharmacokinetic parameters and inter-individual variability were estimated on a random splitting of the dataset in the 2/3 of patients using NONMEM VI software. A covariate analysis was performed to explain a part of inter-individual variability of parameters. Model validation was based on visual predictive check and remaining 1/3 of patients as the test set.</p> <p>Results: A total of 809 patients were included in the study, 566 in the training set and 243 in the validation set. A two-compartment model with first order absorption best fitted the plasma concentrations. Covariate analysis showed that creatinine clearance (CrCl) and sex were associated with an increased value of clearance (CL) ($p < 0.001$). In addition, significant correlation was identified with body weight and central volume of distribution (V2) ($p < 0.001$). For a typical woman (CrCl = 67 ml/min, body weight = 70 kg), the population (CL) was estimated to 0.24 L/h and V2 to 8.03 L, with inter-patient variabilities equal to 65% and 56% respectively. The CL decreases from 0.24 L/h to 0.19 L/h in the typical woman would present with a CrCl equal to 50 ml/min. Coefficient of variation and standard deviation of the residual error were 12.7% and 0.04 mg/L, respectively. The visual predictive check evaluation confirmed that the full model was a good description of data. Finally, the external validation step showed an improvement in the predictive performance of the full model compared to the model without covariates.</p> <p>Conclusions: It is the first pharmacokinetic developed of fondaparinux in a large population of patients after major orthopedic surgery. CrCl, body weight and sex were identified as explaining a part of inter-individual variabilities but the need for a therapeutic drug monitoring is questionable without more clinical investigation. To answer to this question, PK parameters will then be included in a multivariable analysis to assess their correlation with the risk of hemorrhage.</p>	